

Санкт-Петербургский государственный университет

Прокофьева Надежда Юрьевна

**Совершенствование методов изучения
амилоидных агрегатов у дрожжей *Saccharomyces
cerevisiae***

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки «Биология»

основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

профиль «Клеточная и молекулярная биология, биотехнология»

Работа выполнена на кафедре Генетики и биотехнологии

Научный руководитель:

м. н. с., к. б. н. Станислав Александрович Бондарев

Научный консультант:

асп. Полина Борисовна Дроздова

Санкт-Петербург — 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1.Общие свойства амилоидов.....	5
1.2.Общие свойства прионов.....	6
1.3.Разнообразие прионов дрожжей.....	8
1.4.Прион [<i>PSI</i> ⁺].....	10
1.5.Варианты приона [<i>PSI</i> ⁺].....	12
1.6.Основные методы изучения амилоидов.....	13
1.7.Заключение.....	15
2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	16
2.1.Штаммы и условия культивирования.....	16
2.2.Подготовка образцов для выделения белка.....	17
2.3.Выделение белка из клеток дрожжей с помощью стеклянных шариков.....	17
2.4.Выделения белка из клеток с помощью сферопластирования.....	18
2.5.Определение качества сферопластирования.....	19
2.6.Выделение белка из мышц животных.....	19
2.7.Выделение белка из насекомых.....	19
2.8.Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с добавлением SDS (SDS-PAGE).....	20
2.9.Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE).....	20
2.10.Окраски гелей.....	21
2.11.Использование программы ImageJ для сравнения количества белка в пробах.....	21
2.12.Использование коммерческого набора ДНК маркеров в условиях SDD-AGE.....	22
2.13.Капиллярный перенос белков из агарозного геля на мембрану.....	22

2.14.Иммуноблотинг.....	23
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	24
3.1.Маркер молекулярного веса.....	24
3.2.Влияние стадии роста культуры на размер агрегатов.....	30
3.3.Улучшение метода выделения белка из клеток дрожжей.....	32
4.ВЫВОДЫ.....	42
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	43
БЛАГОДАРНОСТИ.....	49

ВВЕДЕНИЕ

Прион [PSI^+] – это генетический детерминант, обнаруженный у дрожжей. Белок Sup35, агрегация которого приводит к образованию приона [PSI^+], в норме участвует в терминации трансляции. В зависимости от того, какую конформацию принимает Sup35 в составе агрегатов, могут образоваться разные варианты [PSI^+].

Варианты [PSI^+] можно подразделить на сильные и слабые. Сильные характеризуются белой окраской колоний и обычно более мелкими агрегатами, а слабые характеризуются более крупными агрегатами, розовой окраской колонии и часто бывают нестабильными, то есть можно наблюдать красные колонии, состоящие из клеток, утративших [PSI^+]. Сила фенотипа [PSI^+] зависит от количества растворимого Sup35, а также способности к делению или фрагментации его полимеров. Для изучения агрегатов Sup35 широко используют метод полуденатурирующего агарозного гель-электрофореза, который позволяет оценить наличие и сравнить размер агрегатов. Размер агрегатов легко сравнить в пределах одного геля, однако сравнение разных экспериментов затруднительно. В рамках работы мы предприняли попытку разработать молекулярный маркер для определения размера агрегатов.

При анализе амилоидных агрегатов используют разные способы выделения белка из клеток дрожжей: с помощью стеклянных шариков, которая имеет ряд недостатков, а также методика выделения белка из сферопластов. В ходе работы мы провели сравнение этих методов и оптимизировали методику выделения белка.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие свойства амилоидов

В настоящее время изучение амилоидных агрегатов набирает большие обороты. Под амилоидами подразумевают фибриллы, которые не растворимы *in vivo*, имеют диаметр от 7,5 до 10 нм и длину от 3 до 100 мкм. Амилоидные фибриллы — это прежде всего неразветвленные фибриллы (Buxbaum and Linke 2012). Для амилоидных фибрилл характерна кросс-бета структура. Кросс-бета-структура подразумевает под собой, что мономеры фибрилл соединены между собой в основном за счет водородных связей между бета-цепями межмолекулярных бета-слоев, которые располагаются перпендикулярно латеральной оси фибриллы. Расположение бета-слоев в амилоидной фибрилле может варьировать, но наличие кросс-бета-структур характерно для всех амилоидов (Nizhnikov *et al.* 2015).

Агрегация белков специфическим образом (с формированием амилоидных агрегатов) может быть причиной различных заболеваний (амилоидозов), в частности нейродегенеративных (Cohen and Kelly 2003). В некоторых случаях развитие заболевания может быть связано с утратой функции агрегированного белка, а в других с появлением токсичности (Jasquemont *et al.* 2017). Для клинической картины амилоидозов характерно наличие аномальных белковых отложений, часто имеющих фибриллярную морфологию. Такие агрегаты можно наблюдать в виде микроскопических включений или бляшек, характеристика которых зависит от специфики заболевания (Taylor *et al.* 2002). При различных заболеваниях агрегаты располагаются в разных частях организма и могут быть специфически локализованы в определенных клетках (Fowler *et al.* 2006). Например, нейродегенеративные заболевания, включая болезнь Альцгеймера и Паркинсона, а также трансмиссивные губчатые энцефалопатии (прионные заболевания) характеризуются при вскрытии гибелью нейронов и белковыми агрегатами (Caughey and Lansbury 2003).

Долгое время считалось, что все амилоиды цитотоксичны, однако были обнаружены непатогенные амилоиды. Оказалось, что амилоидные структуры у млекопитающих функционируют в ходе биогенеза меланосом (Cohen and Kelly 2003). Меланосомы представляют собой многочисленные органеллы млекопитающих, которые вырабатываются в специализированных клетках, таких как меланоциты в коже и клетках пигментного эпителия сетчатки глаза. У представителей разных таксономических групп

меланин обеспечивает защиту от патогенных микроорганизмов и ультрафиолетового излучения. Для созревания меланосом требуется образование специфических нерастворимых фибрилл, которые обеспечивают полимеризацию промежуточных соединений при синтезе меланина на основе тирозина (Rochin *et al.* 2013). Созданный амилоид ускоряет образование меланина *in vitro*, играя функцию каркаса, а также смягчает токсичность, связанную с синтезом меланина, за счет связывания и минимизации диффузии токсичных предшественников меланина (Cohen and Kelly 2003). Таким образом, амилоиды могут быть использованы для физиологических целей клетки.

1.2. Общие свойства прионов

Частным случаем амилоидов являются инфекционные амилоиды, или прионы. Пока не существует четкого определения, что же такое «прион». В широком понимании прионы являются элементами, которые передают и распространяют изменение конформации (Prusiner 1998). С. Прузинер вместе с коллегами впервые выделил прионный агент из мозга больных скрепи животного, и на основании полученных экспериментальных данных сформулировал прионную концепцию (Staniforth and Tuite 2012). В рамках прионной концепции под прионом понимали белковую инфекционную частицу, в которой отсутствует нуклеиновая кислота (Prusiner 1998). Поскольку некоторые особенности заболеваний, вызванных прионами и вирусами, схожи, некоторые ученые с трудом принимали существование прионов, несмотря на множество научных данных, подтверждающих эту концепцию (Viral *et al.* 1997; Manuelidis and Lu 2003). Позже удалось описать уникальные свойства приона, а именно устойчивость к различным факторам, таким как нагревание, действие протеиназ, агентов, повреждающих ДНК, додецил-сульфата натрия (SDS), мочевины, а также к обработке ультрафиолетом, которые подтверждали белковую природу приона (Aiken and Marsh 1990; Prusiner *et al.* 1978).

Прионы широко распространены у разных живых организмов и могут выполнять разные функции в клетках, а также быть причиной патологий. Прионные агрегаты PrP являются наиболее известным примером инфекционного амилоида, который вызывает ряд заболеваний у млекопитающих. Этот белок в норме присутствует в клетках центральной нервной системы (Simoneau *et al.* 2015). Его прионная форма отличается от нормального белка только вторичной структурой, которая придает ему необычные свойства, в частности, устойчивость к действию детергентов, протеиназ (протеиназа К). Прионная форма белка PrP способна вызывать такие заболевания, как различные энцефалопатии

крупного рогатого скота и болезнь куру у человека (Prusiner *et al.* 1983). Не менее интересным примером приона является прион [*Het-s*] у грибов. В клетках его присутствие необходимо для выполнения определенных функций. В клетках гриба *Podospora anserina* прион [*Het-s*] регулирует образование гетерокариона при скрещивании разных штаммов, то есть является важным элементом системы несовместимости. Только в прионной форме белок HET-s способен вызывать реакцию, в результате которой могут погибнуть гетерокарионы, образующиеся при парасексуальном процессе (Aiken and Marsh 1990). Кроме того, прионы грибов могут наследоваться. У *Saccharomyces cerevisiae* и других грибов прионы цитоплазматически наследуются, что не наблюдается в случае прионных заболеваний у млекопитающих (Tuite and Cox 2003).

Заражение млекопитающих прионами несёт не наследственный характер, а происходит при употреблении мяса больного организма или же через хирургические инструменты. Раньше считалось, что передача прионных инфекций возможна только среди близкородственных видов: например, болезнь Крейцфельда-Якоба может передаваться от человека к шимпанзе — но сейчас известны примеры нарушения этого правила. Выяснилось, что этой же болезнью можно заразить коз (Perys *et al.* 2001). Однако подобные примеры немногочисленны, потому что у разных видов наблюдается различия в первичной структуре прионного белка (Patino *et al.* 1996). Наиболее известными прионными болезнями среди млекопитающих считаются губчатая энцефалопатия (коровье бешенство) у крупного рогатого скота, синдром Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, куру и болезнь Крейцфельда-Якоба. Все эти болезни связаны с нарушением конформации белков и летальны для организмов (Nizhnikov *et al.* 2015).

1.3. Разнообразие прионов дрожжей

Saccharomyces cerevisiae является хорошо изученной эукариотической модельной системой, протекающие в которой процессы схожи с происходящими в клетках животных. Открытие прионов дрожжей позволило более детально изучить механизмы передачи наследственной информации посредством белков. Благодаря этому также возможно изучение факторов, которые могут помочь изгнанию прионов. У дрожжей можно выделить три наиболее изученных приона: $[PSI^+]$, $[URE3]$, $[PIN^+]$; при этом первыми наследственными детерминантами, для которых была доказана прионная природа, были $[PSI^+]$ и $[URE3]$ (таблица 1). Затем было выявлено несколько других прионов дрожжей с разным фенотипическим проявлением (таблица 1; Crow and Li 2011). Клетки дрожжей могут утрачивать прион, однако такое событие происходит с достаточно низкой частотой. К тому же, в клетках дрожжей существуют системы, способствующие размножению прионов (Liebman and Chernoff 2012). Эффект прионизации часто заключается в потере функции соответствующего белка в клетке. В некоторых случаях наблюдается увеличение продукции специфических веществ: например, увеличение продукции изо-2-цитохрома с для приона $[OCT^+]$, или же появление устойчивости к фунгицидам, что характерно для приона $[MOD^+]$ (Nizhnikov *et al.* 2015).

Таблица 1. Прионы грибов

Прион	Ген	Белок	Функция белка	Амилоидная структура	Ссылка
[<i>URE3</i>]	<i>URE2</i>	Ure2	Репрессор катаболизма соединений азота	Да	(Wickner 1994)
[<i>PSI</i> ⁺]	<i>SUP35</i>	Sup35	Фактор терминации трансляции eRF3	Да	(Cox 1964)
[<i>PIN</i> ⁺]	<i>RNQ1</i>	Rnq1	Функция неизвестна	Да	(Sondheimer and Lindquist 2000)
[<i>SWI</i> ⁺]	<i>SWI1</i>	Swi1	Регулятор упаковки хроматина	Да	(Zhiqiang Du, Kyung-Won Park 2008)
[<i>OCT</i> ⁺]	<i>CYC8</i>	CYC8	Транскрипционный репрессор	Неизвестно	(Patel <i>et al.</i> 2009)
[<i>MOT3</i> ⁺]	<i>MOT3</i>	Mot3	Транскрипционный фактор	Да	(Alberti <i>et al.</i> 2009)
[<i>GAR</i> ⁺]	<i>PMA1, STD1</i>	Pma1, Std1	Pma1 – протонная помпа Std1 – неизвестно	Нет	(Brown and Lindquist 2009)
[<i>ISP</i> ⁺]	<i>SFP1</i>	Sfp1	Транскрипционный фактор	Неизвестно	(Rogoza <i>et al.</i> 2010; Crow and Li 2011)
[<i>NSI</i> ⁺]	<i>SWI1, RNQ1</i>	Swi1, Rnq1	Изменяет количества мРНК некоторых генов	Да	(Saifitdinova <i>et al.</i> 2010)
[<i>NUP100</i> ⁺]	<i>NUP100</i>	Nup100	Входит в состав комплекса ядерной поры	Да	(Halfmann <i>et al.</i> 2012)
[<i>MOD</i> ⁺]	<i>MOD5</i>	Mod5	Устойчивость к фунгицидам	Да	(Suzuki <i>et al.</i> 2012)

1.4. Прион $[PSI^+]$

Прион $[PSI^+]$ является наиболее широко изученным прионом дрожжей. Очень долго природа детерминанта $[PSI^+]$ была неизвестна, предполагали, что $[PSI^+]$ закодирован в геноме. После создания прионной концепции и открытия прионного детерминанта $[URE3]$ Р. Викнер предположил, что $[PSI^+]$ представляет собой прионную форму Sup35 (Staniforth and Tuite 2012). В клетке Sup35, или eRF3, формирует комплекс факторов терминации трансляции вместе с Sup45, или eRF1. Это происходит, когда в А-сайте рибосомы оказывается находящийся в рамке считывания любой из трёх стоп-кодона (UAA, UAG или UGA), а Sup45 связан с рибосомой. Затем Sup35 связывается с Sup45, помогает ему правильно расположиться для терминации трансляции. Таким образом, Sup35 способствует правильному расположению Sup45 внутри рибосомы, за счет чего эффективно осуществляется терминация трансляции. Но это не единственная функция, которую выполняет белок Sup35 в клетке. Кроме этого, белок Sup35 участвует в формировании актинового цитоскелета. Оказалось, что белок Sup35 взаимодействует с белком Sla1, который принимает участие в формировании микрофиламентов. При прионизации Sup35 происходит уменьшение функциональных молекул белка Sup35 (Valouev *et al.* 2002). Б. Кокс обнаружил, что при наличии детерминанта $[PSI^+]$ наблюдается супрессорный фенотип (Cox 1964).

В клетках $[PSI^+]$ поддерживается за счет наличия белка Sup35. $[PSI^+]$ наследуется по неменделевскому типу, а агрегаты Sup35 локализованы в цитоплазме. Когда возникает $[PSI^+]$, он может стабильно поддерживаться благодаря тому, что новосинтезированные молекулы белка приобретают прионную конформацию. Прион $[PSI^+]$ можно вылечить путем обработки миллимолярными концентрациями гидрохлорида гуанидина; при этом прион может повторно возникнуть в вылеченных клетках (Wickner 1994).

В дрожжевых прионных белках, в частности, Sup35, выделяют участки, которые также называют «прионными доменами», или PrDs (Prion Forming Domain). Эти домены необходимы для образования и поддержания прионов. Кроме того, их наличия достаточно для поддержания приона даже в отсутствие других частей белка (Crow and Li 2011). В белке Sup35 выделяют три домена (рисунок 1; Tuite *et al.* 2015).

N-концевой домен (1–123 а.к.) обогащен остатками глутамина и аспаргина. Этот домен необходим для поддержания приона Sup35 (Bateman and Wickner 2013). Также N-

концевой домен в норме функционирует в процессе общей циркуляции мРНК, то есть взаимодействует с поли-(А)-связывающим белком (Hosoda *et al.* 2003). Кроме того, N-домен белка Sup35 взаимодействует с белком Sla1, который участвует в формировании актиновых микрофиламентов (Bailleul *et al.* 1999). М-домен (124–253 а.к.) обогащен заряженными аминокислотами, а именно лизином и глутаминовой кислотой, и, скорее всего, поддерживает баланс между агрегированными и неагрегированным состояниями белка за счет взаимодействия с Hsp104. Белок Hsp104, который является шапероном из семейства Hsp100, обеспечивает размножение приона благодаря тому, что разрезает агрегаты белка Sup35 (Kushnirov *et al.* 2006). С-домен (254–685 а.к.) Sup35 отвечает за функцию фактора терминации трансляции (Stansfield *et al.* 1995; Zhouravleva *et al.* 1995). При переходе Sup35 в состав агрегатов возникают стерические препятствия для участия этого домена в терминации трансляции (Liu *et al.* 2002).

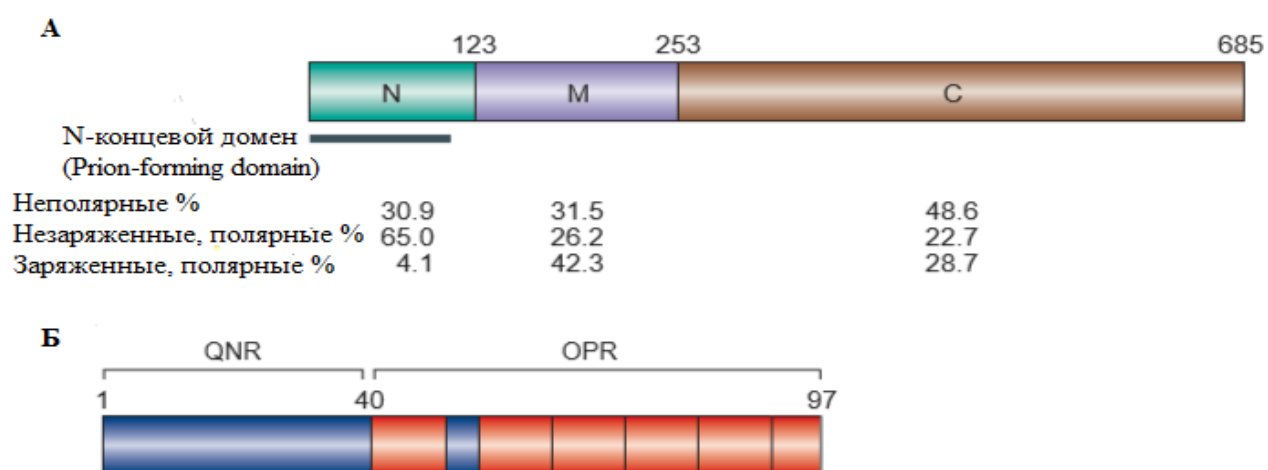


Рисунок 1. Доменная структура белка Sup35 А. В белке Sup35 выделяют три домена на основании расположения первых трёх метиониновых (Met) остатков: N (аминоконцевой) район — область между первым метиониновым остатком (Met1) и 123-м остатком аминокислоты; М (средний) — область между 124-м метиониновым остатком (Met 124) и 253-м остатком аминокислоты; С (карбоксиконцевой) район — участок от 254-го метионинового остатка (Met 254) до карбоксильного конца белка (685-й аминокислотный остаток). Распределение неполярных, незаряженных полярных и заряженных полярных аминокислот значительно варьирует между тремя областями молекулы Sup35. N-область охватывает прионнообразующий домен (PrD), в котором высокая доля незаряженных полярных аминокислот. Б. Минимальный PrD Sup35 состоит из 97 аминокислотных остатков. Внутри этой области находятся две структурно и функционально различающиеся подобласти: QN-богатая (QNR) область и область, которая содержит пять полных (R1-R5) и одну часть копии (R6) олигопептидного повтора (OPR, область повторения олигопептидов). По Tuite *et al.* 2015.

1.5. Варианты приона [PSI^+]

Варианты [PSI^+] представляют собой прионные конформации белка Sup35. Сила фенотипа [PSI^+] зависит от количества растворимого Sup35, а также способности к делению или фрагментации его полимеров. Сильные варианты [PSI^+] обладают высокой митотической стабильностью и проявляют высокую эффективность супрессии нонсенс-мутаций, например *ade1-14*, а слабые варианты [PSI^+] часто обладают низкой митотической стабильностью и слабо выраженным супрессорным фенотипом (Crow and Li 2011). Клетки сильных вариантов приона [PSI^+] образуют белые колонии, а клетки слабых вариантов — розовые (рисунок 2; Derkatch *et al.* 1996).

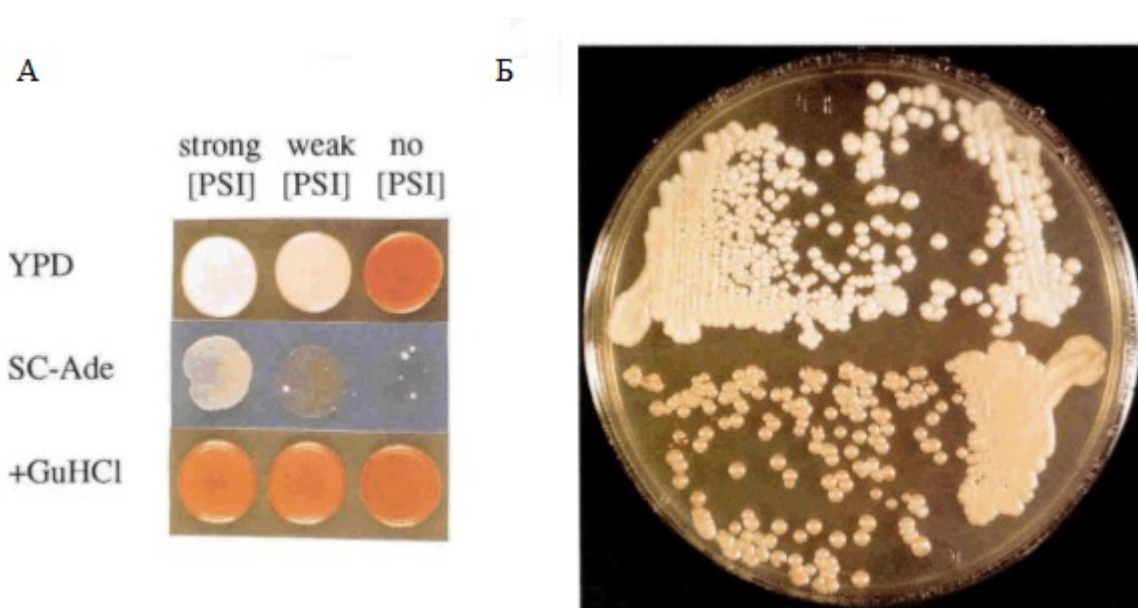


Рисунок 2. Варианты приона [PSI^+]. А. Штаммы, содержащие сильные варианты [PSI^+] (strong), лучше растут на среде без аденина (SC-Ade) и имеют более белый цвет колоний на полной среде (YPD), чем штаммы, содержащие слабые (weak) варианты [PSI^+]. Эти различия устраняются при инкубации на среде, содержащей гидрохлорид гуанидина (+GuHCl), которая излечивает [PSI^+]. Различия в цвете отражают различия в силе супрессии и митотической стабильности варианта приона. Б. Слабые и сильные изоляты [PSI^+], субклонированные на YEPD (снизу и сверху). По Derkatch *et al.* 1996.

Кроме того, варианты отличаются по способности преодолевать барьеры между видами, а также по-разному реагируют на сверхпродукцию или дефицит шаперонов (Díaz-Avalos *et al.* 2005). От того, насколько эффективно шапероны Hsp104 осуществляют фрагментацию агрегатов прионов, зависит вариант приона и сила фенотипа. Вариант тем сильнее, чем меньше размер агрегата Sup35 (Kryndushkin *et al.* 2003). Согласно пространственной модели, прионы дрожжей состоят из параллельных бета-листов, и в

рамках этой структуры могут существовать различные конформации, которые приводят к различным вариантам прионов (Liebman and Chernoff 2012).

1.6. Основные методы изучения амилоидов

Понимание свойств амилоидных фибрилл зависит от знания их молекулярной структуры. Из-за неэффективности многих традиционных подходов и по ряду технических причин для определения структуры амилоида удобнее всего использовать метод ядерно-магнитного резонанса (ЯМР). Амилоидные фибриллы могут иметь относительно однородные структуры, что позволяет получить более высококачественные данные ЯМР (Tusko 2011).

Флуоресцентный краситель тиофлавин Т (ThT) проявляет повышенную флуоресценцию при длине волны 450 нм, когда он взаимодействует с амилоидными фибриллами. Этот краситель широко используется для наблюдения за процессом образования фибрилл *in vitro*. Тиофлавин является полезным реагентом для мониторинга образования фибрилл у разных организмов (Sulatskaya *et al.* 2010). Тиофлавин — это небольшая молекула, содержащая два ароматических кольца. Благодаря свободному вращению колец относительно друг друга флуоресценция гасится, но когда происходит связывание тиофлавина с фибриллами, положение колец становится фиксированным, и происходит возрастание флуоресценции. Максимальный сигнал флуоресценции зависит главным образом от общей концентрации тиофлавина, а не от соотношения количества амилоидов к тиофлавину (Xue *et al.* 2016).

Для анализа тканей на присутствие амилоида используют световую микроскопию и различные красители. Специфическое связывание Конго красного рассматривают как неотъемлемое свойство амилоидов, хотя точный механизм, ответственный за связывание Конго красного с амилоидными фибриллами, неизвестен (Buxbaum and Linke 2012). Существовали гипотезы, что амилоидные фибриллы встраивают в себя краситель, образуя таким образом кристалл. При этом степень выраженности окраски зависят от толщины образовавшегося кристалла. Связывание красителя Конго красного с амилоидными фибриллами приводит к изменению спектра поглощения красителя. При этом сам краситель имеет ряд существенных недостатков, одним из них является тот факт, что само вещество влияет на агрегацию (Tusko 2011).

Одним из наиболее распространенных методов изучения белков, а также амилоидных агрегатов, является электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE), который проводят в присутствии ионного детергента SDS. За счет того, что SDS формирует комплексы с разными белками, у них выравнивается общий заряд, поэтому движение белков в геле зависит только от их размера, что позволяет проводить разделение только по молекулярной массе. Благодаря своей простоте и устойчивости агрегатов к действию сильных ионных детергентов, таких как SDS, этот метод является одним из наиболее распространенных (Rosen *et al.* 2010). Визуализацию белков производят разными способами, в частности, с помощью окраски красителем Кумасси. К сожалению, использование полиакриламидного геля позволяет получить только информацию о наличии или отсутствии амилоидных агрегатов в пробе, но не изучить их характеристики. Полиакриламидный гель имеет слишком мелкие поры, даже при использовании маленькой концентрации акриламида, и агрегаты, размер которых может достигать 4 МДа, не входят в гель. При инкубации проб в содержащем SDS буфере в течение нескольких минут при 100 °C агрегаты распадаются на мономеры. В таком случае сравнение проб, подвергнутых и не подвергнутых термической обработке, позволяет сделать вывод о наличии агрегатов и доле молекул изучаемого белка, находящихся в составе агрегатов (Kryndushkin *et al.* 2003).

Наряду с SDS-PAGE, для анализа размера амилоидных агрегатов в лабораторной практике активно используют электрофорез в полуденатурирующих условиях в агарозном геле (SDD-AGE; Kushnirov *et al.* 2006; Halfmann and Lindquist 2008). Размер пор в агарозном геле намного больше, чем в полиакриламидном, что позволяет разделять крупные агрегаты с высокой молекулярной массой, достигающей нескольких МДа. Обычно в качестве маркеров молекулярного веса используют гомогенаты мышц животных (например, препарат сердечной мышцы кролика или препарат миофибрил кролика), которые содержат белок с высокой молекулярной массой титин (до 4200 кДа) и небулин (до 740 кДа) (Kushnirov *et al.* 2006). Этот метод оценки имеет существенный недостаток. Дело в том, что эти белки (титин и небулин) дают диапазон, в котором мы можем определить размер агрегатов, но только относительно двух точек (положения небулина и титина), что не позволяет объективно оценить размер агрегатов, а дает лишь приблизительную оценку размера.

1.7. Заключение

Для изучения амилоидных агрегатов в дрожжевых клетках используют большое количество методов, особенно широко SDD-AGE. Благодаря этому методу можно легко сравнивать размеры агрегатов в пределах одного геля, однако сравнение разных экспериментов довольно-таки затруднительно. Кроме того, использование экстрактов мышц животных дает лишь приблизительную оценку размера. При анализе амилоидных агрегатов используют разные способы выделения белка из клеток дрожжей. В нашей лаборатории используют методику выделения белка из клеток дрожжей с помощью стеклянных шариков (Kushnir *et al.* 2006), которая имеет ряд недостатков. В литературе описана другая методика выделения белка из клеток дрожжей, основанная на получении сферопластов способом (Halfmann and Lindquist 2008). **Цель** работы заключается в улучшении методов изучения агрегатов Sup35 у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Из поставленной цели вытекают следующие задачи:

1. Разработка метода оценки размера амилоидных агрегатов с помощью набора высокомолекулярных маркеров;
2. Сравнение размера агрегатов Sup35 на разных стадиях роста культуры дрожжей;
3. Сравнение методик выделения белков с помощью механического разрушения клеток и получения сферопластов;
4. Подбор оптимальных параметров для получения сферопластов и выделения белка из них.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Штаммы и условия культивирования

В нашей работе мы использовали следующие штаммы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: OT56, 2-OT56, 10-7A-Д832, 7A-Д832. Их генотипы приведены в таблице 2.

Таблица 2. Штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип
10-7A-Д832	<i>MATα ade1-14(UGA) his7-1(UAA) leu2 lys2 trp1-289 ura3 SUP35::TRP1 [URA3 SUP35][PSI⁺][PIN⁺]</i>
7A-Д832	<i>MATα ade1-14(UGA) his7-1(UAA) leu2 lys2 trp1-289 ura3 SUP35::TRP1 [URA3 SUP35] [psi⁻] [PIN⁺]</i>
OT56	<i>MATα ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 [PSI⁺] [PIN⁺]</i>
2-OT56	<i>MATα ade1-14(UGA) trp1-289(UAG) ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 [psi⁻][pin⁻]</i>

В таблице 1 указаны стандартные обозначения мутаций и идиоморфов MAT. Аллель *ade1-14* содержит преждевременный стоп-кодон UGA (Bertram *et al.* 2000), аллель *his7-1* – преждевременный стоп-кодон UAA (Chabelskaya *et al.* 2004), а аллель *trp1-289* – UAG (Chabelskaya *et al.* 2004). Аллель *his3* содержит делецию в 200 нуклеотидов (Struhl 1984). Ген *LEU2* имеет двойные мутации *leu2-3,112* (Hinnen *et al.* 1978), а ген *URA3* содержит инсерцию дрожжевого транспозона *ura3-52* (Rose and Winston 1984).

Штаммы 10-7A-D832 и 7A-D832 (Bondarev *et al.* 2013) являются изогенными. Их различие заключается в наличии приона [PSI⁺]. Оба штамма несут делецию хромосомной копии *SUP35* и компенсирующую плазмиду pYCH-U2 с этим геном (в генотипе обозначена [URA3 SUP35]).

Штаммы OT56 (Derkatch *et al.* 1997; Newnam *et al.* 1999) и 2-OT56 (Matveenko *et al.* 2016) различаются статусом прионов [PSI⁺] и [PIN⁺]. Штамм OT56 и его близкие производные широко используют для изучения дрожжевых прионов, в частности, [PSI⁺] (Chernoff *et al.* 1999).

Дрожжевые штаммы выращивали на полной среде YEPD (Kaiser *et al.* 1994) при 30°C. Наличие приона [*PSI*⁺] мы выявляли по способности дрожжевых штаммов расти на среде без аденина и по белому цвету колоний на 1/4 YEPD (Eaglestone *et al.* 1999).

2.2. Подготовка образцов для выделения белка

Клетки нужного штамма засеивали в жидкую среду YEPD (Kaiser *et al.* 1994) объемом 10 мл в кровяные баночки и инкубировали в течение ночи на качалке со скоростью 200 оборотов в минуту при 30°C. На следующий день мы измеряли оптическую плотность (OD₆₀₀) культуры и разводим её до OD₆₀₀ = 0,2. Затем культуру инкубировали при тех же условиях до стадии логарифмического роста (OD₆₀₀ = 0,6 – 0,8). Клетки осаждали центрифугированием при скорости 2300 RCF (5000 об./мин) при 4°C в течение 10 минут и быстро сливали среду. Затем осадок промывали 10 мл холодной дистиллированной воды, центрифугировали пробы при скорости 2300 RCF (5000 об./мин) при 4°C в течение 10 минут и сливали воду. Клетки ресуспендировали в небольшом объеме воды, полученную суспензию переносили в пробирку объёмом 1,5 мл. Далее мы осаждали клетки центрифугированием при скорости 6400 RCF (14000 об./мин) в течение 1 минуты при 4°C, и сливали жидкую надосадочную фракцию. Осажденные клетки замораживали и хранили при -80°C. При выделении белка с помощью сферпластирования клетки не замораживали.

2.3. Выделение белка из клеток дрожжей с помощью стеклянных шариков

Выделение белка механическим способом проводили по методике Кушнирова с соавторами (Kushnirov *et al.* 2006) с изменениями. Для этого мы ресуспендировали осажденные клетки в лизирующем буфере (100 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ БМЭ, 2% ингибиторы протеаз, 2 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF)) в объеме, приблизительно равном объему клеток. Затем мы добавляли к суспензии стеклянные шарики (Sigma) в объеме, приблизительно равном объему суспензии.

Далее мы встряхивали содержимое эппендорфов на гомогенизаторе FastPrep24 ("MP Biomedicals") при скорости 6,0 M/S в течение 30 секунд и затем быстро переносили в лёд на 1 минуту. Данную процедуру повторяли 3 раза. Затем мы осаждали остатки клеток и шарики центрифугированием при скорости 2300 RCF (5000 об./мин) при 4°C в течение 10 минут и переносили надосадочную фракцию в новый эппендорф. Далее мы добавляли

4х кратный буфер для нанесения (2х ТАЕ (80 мМ Трис, 40 мМ уксусной кислоты, 2 мМ ЭДТА (рН 8,0)), 20% глицерин, 8% SDS, 0,2% бромфеноловый синий) к пробам, затем часть проб каждого штамма кипятили в течение 5 минут при 100 °С, другую часть проб мы инкубировали при комнатной температуре 5 минут.

2.4. Выделения белка из клеток с помощью сферопластирования

Для выделения белка из клеток дрожжей с использованием сферопластов (сферопластный способ) мы опирались на опубликованный протокол (Halfmann and Lindquist 2008). В таблице 3 представлены составы буферов для сферопластирования, использованных в работе. Сначала мы ресуспендировали осажденные клетки дрожжей в 1 мл сферопластирующего буфера с ферментом (зимолиазой или литиказой), указанным в таблице 3, и инкубировали пробы при 30°C в течение 30 минут. При необходимости мы использовали разное время инкубации: 15, 30, 45 и 60 минут. Далее мы центрифугировали пробы при 800 RCF (1700 об./мин) в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего аккуратно удаляли надосадочную жидкость. Полученные сферопласты ресуспендировали в лизирующем буфере (100 мМ Трис-НCl (рН 7,5), 50 мМ NaCl, 10 мМ БМЭ, 2% ингибиторов протеаз, 2 мМ PMSF) и перемешивали содержимое проб на гомогенизаторе FastPrep24 ("MP Biomedicals") при 6,0 M/S в течение 30 секунд, после чего быстро переносили в лед на 1 минуту; данную процедуру повторяли 3 раза. Затем обломки клеток осаждали при 4000 RCF (8700 об./мин) в течение 2 минут, а полученный супернатант переносили в новый. Далее, мы добавляли 4х кратный буфер для нанесения к пробам, затем часть проб каждого штамма кипятили в течение 5 минут при 100°C, другую часть проб мы инкубировали при комнатной температуре 5 минут.

Таблица 3. Состав буферов для сферопластирования

Компоненты сферопластирующего буфера	Протоколы выделения белка		
	Методика выделения белка по Халфманну	Методика выделения белка с использованием зимолиазы	Модифицированный протокол выделения белка
D-сорбитол	1,2 М		
MgCl ₂	0,5 мМ		

Трис-НСl (рН 7,5)	20 мМ		
БМЭ	50 мМ		
PMSF	—	—	2 мМ
Зимолиаза100-Т	0,5 мг/мл	—	—
Зимолиаза 20-Т	—	2,5 мг/мл	—
Литиказа	—	—	0,06 мг/мл

2.5. Определение качества сферопластирования

Эти эксперименты проводили для двух разных ферментов: литиказы и зимолиазы-20Т. Сначала мы ресуспендировали осадок клеток в сферопластирующем буфере с ферментом. Далее мы отбирали аликвоту каждые 15 минут в течение часа и измеряли оптическую плотность суспензии при длине волны 600 нм. Параллельно с этим мы подсчитывали количество клеток с помощью камеры Горяева по 5 большим квадратам, предварительно добавив 5 мкл 1% SDS для лизиса сферопластов. На основании произведенных расчетов по полученным данным мы строили графики зависимости количества клеток или оптической плотности от времени. Для построения графиков использовали язык программирования R (The R Core Team 2015).

2.6. Выделение белка из мышц животных

Для выделения белка из мышц животных мы использовали образец охлажденной куриной грудки (*Gallus gallus*) и замороженный кусочек мышц крысы (*Rattus norvegicus*), любезно предоставленные Ю.В. Соповой. Небольшой кусочек мышц весом 2 – 5 г помещали в ступку, после чего добавляли жидкий азот и растирали образец пестиком. К полученным образцам добавляли буфер (0,05 М Трис-НСl, 0,02 М ЭДТА) и переносили в эппендорф. Далее полученные пробы смешивали с 4х кратным буфером для нанесения и кипятили в течение 5 минут.

2.7. Выделение белка из насекомых

Для выделения белка из дрозофилы мы использовали их имаго. Предварительно мух выдержали в пустой пробирке в течение суток для очистки кишечника. После этого мух переносили в ступку, добавляли 1х буфер PBS (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 1 мМ

Na₂HPO₄, 2 мМ КН₂РO₄) и измельчали материал с помощью пестика. Затем мы переносили полученный гомогенат в эппендорф и добавили 4х буфер для нанесения с 1 М DTT. Далее пробы кипятили 5 минут при 100°C.

В случае выделения белка из личинок *Chironomus sp.* мы также растирали пестиком в ступке образец мотыля, приобретенный в зоомагазине, после чего добавляли к полученному материалу 0,05 М Трис-НCl и 0,02 М ЭДТА и переносили в эппендорф. Затем мы добавляли к пробам 4х кратный буфер для нанесения и кипятили пробы 5 минут.

2.8. Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле с добавлением SDS (SDS-PAGE)

Сначала мы собирали систему для заливки геля (BioRad). После этого готовили раствор для заливки 8% нижнего геля (на 5 мл: 2,3 мл H₂O, 1,3 мл 1,5 М Трис-НCl (pH 8,8), 1,3 мл 30% смеси акриламида и бисакриламида (29:1), 50 мкл 10% SDS, 50 мкл 10% персульфат аммония, 3 мкл TEMED) и переносили его в пространство между стеклами с помощью микропипетки. Затем мы добавляли 2 мл деионизированной воды инкубировали систему около 20 минут при комнатной температуре до завершения полимеризации. После полимеризации нижнего геля, мы сливали воду и готовили раствор для заливки 5% верхнего геля (на 2 мл: 1,4 мл H₂O, 250 мкл 1 М Трис-НCl (pH 6,8), 330 мкл 30% акриламид смесь акриламида и бис-акриламида (29:1), 20 мкл 10% SDS, 20 мкл 10% пересульфат аммония, 2 мкл TEMED). Потом мы переносили раствор в систему и инкубировали до завершения полимеризации геля. Готовый гель помещали в зажим с электродами и устанавливали его в камеру. Далее мы готовили 1х Трис-глициновый буфер (25 мМ Трис-НCl, 192 мМ глицин, 0,1% SDS), который переливали в камеру, после чего пробы наносили на гель. Электрофорез проводили при 180 В до выхода бромфенолового синего из нижнего геля (около часа).

2.9. Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE)

Полуденатурирующий электрофорез в агарозном геле (SDD-AGE) проводили по методике Кушнирова с соавторами (Kryndushkin *et al.* 2003) с изменениями. На первом этапе мы заливали гель. Сначала для этого готовили 1,5% раствор, агарозы в 1х TAE (40 мМ Трис-НCl, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА) и нагревали его до полного растворения агарозы. Затем к раствору добавляли SDS до концентрации 0,1%, после чего заливали раствор агарозы на подложку. Застывший гель помещали в камеру, которую

заполняли 1х буфером TAE с 0,1% SDS. Камеру для электрофореза мы помещали в коробку со льдом. Электрофорез проводили в течение 4 часов при 30 В.

2.10. Окраски гелей

Для визуализации белков мы использовали краситель Кумасси R-250. Для окраски гелей после SDD-AGE мы использовали два способа. В одном случае гель инкубировали в 0,1% растворе Кумасси R-250 с 50 % содержанием метанола на шейкере. После этого гель отмывали сутки при комнатной температуре. Согласно другому способу гель красили 1 час при 50 °С на шейкере, после чего отмывали в течение ночи при комнатной температуре.

Для оценки общей эффективности выделения белка гель после проведения SDS-PAGE кипятили в 0,25 % растворе Кумасси R-250 с 45% содержанием этанола и 10% содержанием уксусной кислоты в течение 1 минуты в микроволновой печи, затем отмывали (при кипячении) в дистиллированной воде. После отмывки гель сканировали.

2.11. Использование программы ImageJ для сравнения количества белка в пробах

Для сравнения количества белка в пробах мы использовали отсканированные изображения гелей, которые обрабатывали в программе ImageJ (Michael Abràmoff, Paulo Magalhães 2005). Сначала мы использовали команду "Type", что бы конвертировать отсканированное изображение геля в 8-битное, при этом изображение геля преобразуется в полутоновое. После этого мы использовали команду "Analyze" и с помощью команды "Set Measurements" задавали те параметры, которые дальше анализировали. После чего открывали диалоговое окно "Calibrate", которое позволяет производить калибровку по стандартам оптической плотности, и выделяли дорожку на геле. Затем использовали команду "Measure" и вычисляли оптическую плотность выделенной области изображения для каждой дорожки, которые отображались в специальном окне "Results". Кроме того, обсчет такой же области выделения делали и для фона геля для пересчета полученных значений (вычитали значения фона из значений оптической плотности других областей). Перерасчет проводили с помощью программы Microsoft Excel и после этого на агарозный гель наносили уже одинаковое количество белка.

2.12. Использование коммерческого набора ДНК маркеров в условиях SDD-AGE

Перед проведением SDD-AGE набор маркеров молекулярного веса ДНК ("Сибэнзим") наносили в лунку в количестве 2,4 мкг. Перед окрашиванием мы отделяли дорожку геля с ДНК-маркером и инкубировали её в растворе бромистого этидия (0,1–0,5 мкг/мл) в течение 20 минут. Мы использовали трансиллюминатор для выявления ДНК-маркера. Рядом с гелем на прибор клали линейку, изображение фиксировали с помощью фотоаппарата. Перед проведением детекции белков на приборе Gene Gnome мы также измеряли размер мембраны с помощью линейки, чтобы соотнести масштаб фотографий, полученных на разных приборах, с разной матрицей.

2.13. Капиллярный перенос белков из агарозного геля на мембрану

По окончании электрофореза мы готовили систему для переноса. Сначала мы вырезали прямоугольники из газетной бумаги, которые соответствовали размеру геля, так чтобы они составляли стопку толщиной не менее 2 см. Также мы вырезали не менее 7 прямоугольников такого же размера из ватмана ("Whatman International Ltd") и полоску (фитиль), ширина которой соответствовала длине геля, а длина составляла около 25 см. Далее мы вырезали поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану ("Amersham"), соответствовавшую размеру геля, и активировали её в метаноле. После этого мы промывали мембрану в буфере TBS (30 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl). Затем мы устанавливали систему для переноса, как показано на рисунке 3.

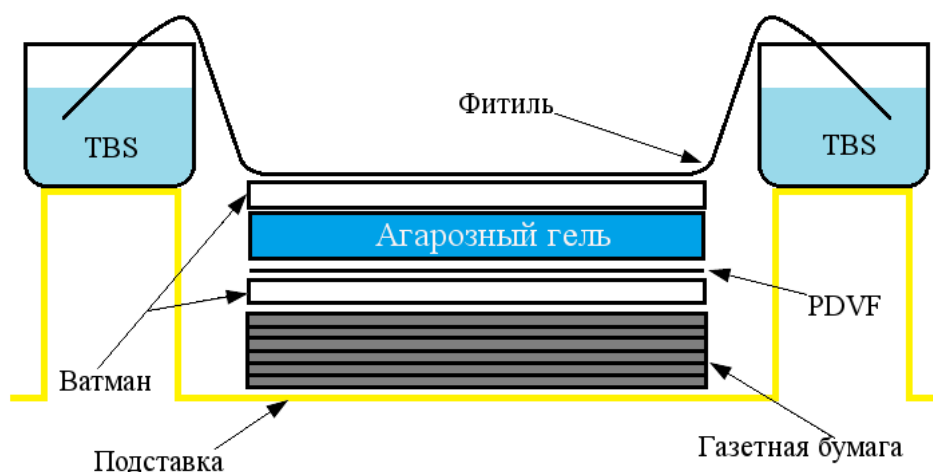


Рисунок 3. Схема установки для капиллярного переноса. Нижний слой ватмана состоял из трёх сухих прямоугольников и два, смоченных в TBS. Верхний слой ватмана состоял только из двух прямоугольников и фитиля, смоченного в TBS.

Полоску ватмана (фитиль), смоченную в TBS, клали сверху, так чтобы концы полоски по бокам были погружены в кюветы с TBS. После этого мы устанавливали пластинку с грузом сверху на получившуюся конструкцию. Собранную систему для переноса инкубировали в холодильнике в течение ночи.

2.14. Иммуноблотинг

После переноса белков на мембрану мы инкубировали мембрану в 5% молоке, растворенном в буфере TTBS (50 mM Трис-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) около 1 часа на шейкере. Далее мы инкубировали мембрану в первичных антителах, узнающих Sup35, (смесь SE4290 и SE4291 (Chabelskaya *et al.* 2004) в соотношении 3:1 по объему), разведенных в 1000 раз в TTBS с 2% обезжиренным сухим молоком, не менее двух часов в холодильнике. Эту и последующие процедуры мы проводили на орбитальном шейкере. Затем мы отмывали мембрану в TTBS 3 раза по 10 минут. Потом мы инкубировали мембрану с вторичными антителами ("Amersham"), растворенными в 20000 раз в 5% молоке с TTBS не менее 1 часа. Затем мы снова отмывали мембрану в TTBS 3 раза по 10 минут. После этого мы обрабатывали мембрану специальным китом ("Amersham") и помещали в прозрачный файл. Сначала мы смешивали все реагенты, наносили их на мембрану и инкубировали около 5 минут при комнатной температуре. Затем мы помещали мембрану в прибор Gene Gnome и делали серию снимков. Время съемки без света составляло от 5 до 10 минут в зависимости от интенсивности сигнала, с белым светом не более 30 секунд.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Маркер молекулярного веса

Одной из задач нашей работы являлась разработка метода для анализа размера амилоидных агрегатов. С помощью метода агарозного электрофореза в полуденатурирующих условиях (SDD-AGE; Kryndushkin *et al.* 2003) можно сравнивать размеры крупных белковых комплексов, устойчивых к действию SDS, к которым в первую очередь относятся амилоидные агрегаты. Недостатком этого метода является то, что он позволяет сравнивать размеры агрегатов только в пределах одного эксперимента, на одном форе, при этом отсутствует четкая привязка размеров агрегатов к конкретным значениям молекулярного веса. Для решения этой проблемы мы хотели разработать набор маркеров молекулярного веса, который можно широко использовать при анализе размера амилоидных, в частности, прионных агрегатов.

Ранее для оценки размера агрегатов было предложено использовать экстракт мышц животных (как правило, курицы или кролика) в качестве маркера (Kushnirov *et al.* 2006). Дело в том, что в мышцах животных присутствует белок с высокой молекулярной массой — титин, который играет важную роль в процессе сокращения мышц. У разных организмов размер титина различается: так, у многих насекомых молекулярный вес титина не превышает 1 МДа, а у некоторых млекопитающих достигает 4 МДа (рисунок 4). Помимо титина в анализе также используют другой мышечный белок небулин, размер которого составляет порядка 700 кДа. Он обеспечивает механическую стабильность тонких филаментов (Nave 1989).

Высокомолекулярные белки титин и небулин дают диапазон, в котором мы можем определить размер агрегатов. Однако в таком случае расположение агрегатов можно оценить только относительно двух точек (положения небулина и титина), которые делят возможный интервал размеров на три части, а размер полос в средней части этого диапазона можно определить лишь приблизительно. Исходя из этого, мы решили попробовать отработать методику, позволяющую выделять титин из различных организмов, и, таким образом позволяющую получать набор маркеров с широким диапазоном. Такой набор довольно точно позволял бы нам оценивать размер искомой молекулы.

Для создания упомянутого набора маркеров мы проанализировали размеры известных титинов, информация о которых была представлена в базе данных UniProt (Arweiler *et al.* 2004). Этот ресурс посвящен именно белковым последовательностям и их аннотации. Объектом нашего интереса были белки, имеющие вес более 1 МДа (рисунок 4.) Информацию из базы данных взяли в феврале 2017 года. К сожалению, данных о титине курицы в базе данных UniProt не оказалось, поэтому мы использовали значения, указанные в другом источнике (Granzier *et al.* 2007).

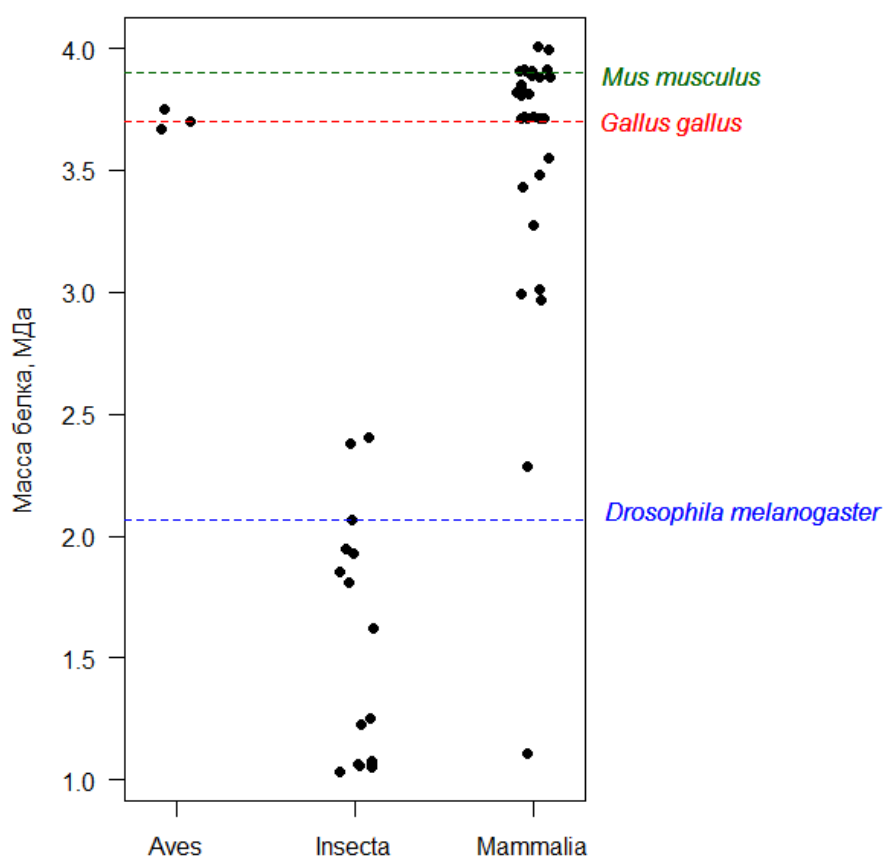


Рисунок 4. Распределение массы белка титина у разных таксономических групп; молекулярная масса титина для наиболее популярных модельных объектов, отмечена пунктирными линиями. Каждая точка на графике соответствует значению массы белка одного вида.

Проведенный анализ подтвердил, что смесь титинов разных организмов может быть использована для создания маркера молекулярного веса. Пользуясь данными UniProt, мы решили предложить список животных, титины которых могли бы сформировать наиболее точный набор маркеров. Для этого мы старались подобрать такие организмы, у которых титин отличается примерно на 0,5 МДа по данным базы. Этот набор животных представлен в таблице 4, однако эти организмы весьма труднодоступны, поэтому мы

сконцентрировали наше внимание исключительно на организмах, образцы которых мы смогли получить: *Chironomus sp.*, *Drosophila melanogaster*, *Gallus gallus*, *Rattus norvegicus*.

Таблица 4. Объекты, подходящие для получения маркеров молекулярного веса

Масса белка, МДа	Латинское название	Русское название
4,1	<i>Heterocephalus glaber</i>	Голый землекоп
4	<i>Cricetulus griseus</i>	Китайский хомяк
3,9	<i>Mus musculus</i>	Домовая мышь
3,6	<i>Pongo abelii</i>	Суматранский орангутан
3,1	<i>Campylomormyrus compressirostris</i>	Слонорыл
2,4	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Безжалая пчела
2,1	<i>Drosophila melanogaster</i>	Дрозофила фруктовая
2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Нематода
1,6	<i>Harpegnathos saltator</i>	Прыгающий муравей
1,1	<i>Atta colombica</i>	Муравей-листорез

Из-за отсутствия антител, которые бы могли узнавать титин разных видов, мы решили визуализировать этот белок с помощью окраски Кумасси R-250. При этом в ходе этих экспериментов мы планировали окрашивать белки в геле после SDD-AGE. Для отработки методики мы использовали очищенные белки с известной массой: бычий сывороточный альбумин (69 кДа) и тиреоглобулин (660 кДа) – в виде растворов в натрий-фосфатном буфере в концентрации 2,5 мг/мл. Белки наносили в серии двукратных разведений. После проведения SDD-AGE подбирали опытным путем способ окраски агарозных гелей (рисунок 5). Мы выяснили, что чувствительность метода при окраске геля в течение часа составляет около 10 мкг, а при окрашивании геля в шейкере в течение ночи – около 5 мкг, и заключили, что оба метода подходят для окраски гелей.

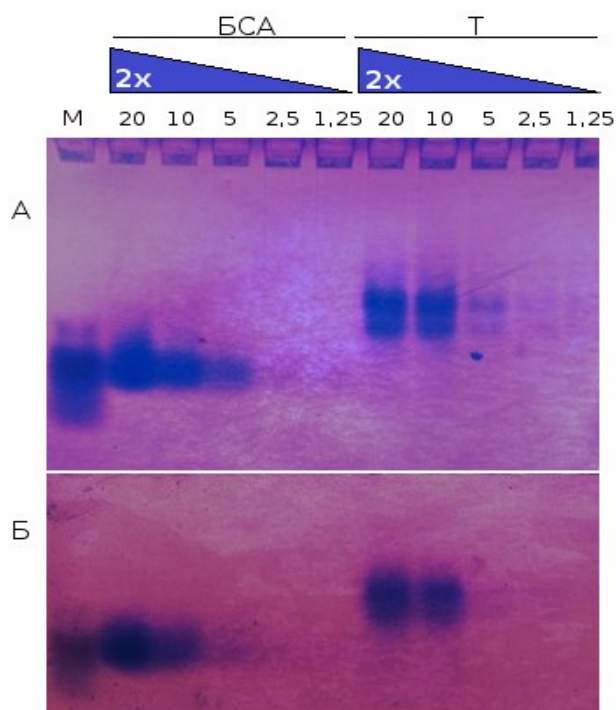


Рисунок 5. Качество визуализации белковых проб зависит от способа окрашивания геля. Окраску агарозного геля производили в растворе Кумасси R-250. А – гель красили ночь при 18 °С. Б – гель красили 1 час при 50 °С. Над дорожками указано количество нанесенного белка в мкг. М – маркеры молекулярного веса белков. Т – тиреоглобулин, БСА – бычий сывороточный альбумин.

В ходе работы мы провели серию выделений белков из животных: личинки *Chironomus sp.* и имаго *Drosophila melanogaster*, а также *Gallus gallus* и *Rattus norvegicus* (таблица 4). Чаще всего мы выделяли титин непосредственно из мышц животных (*G. gallus*, *R. norvegicus*), в некоторых случаях мы использовали животных целиком (*Chironomus sp.*, *D. melanogaster*). Выделенные белки подвергали SDD-AGE, после чего окрашивали гель красителем Кумасси R-250 (рисунок 6).

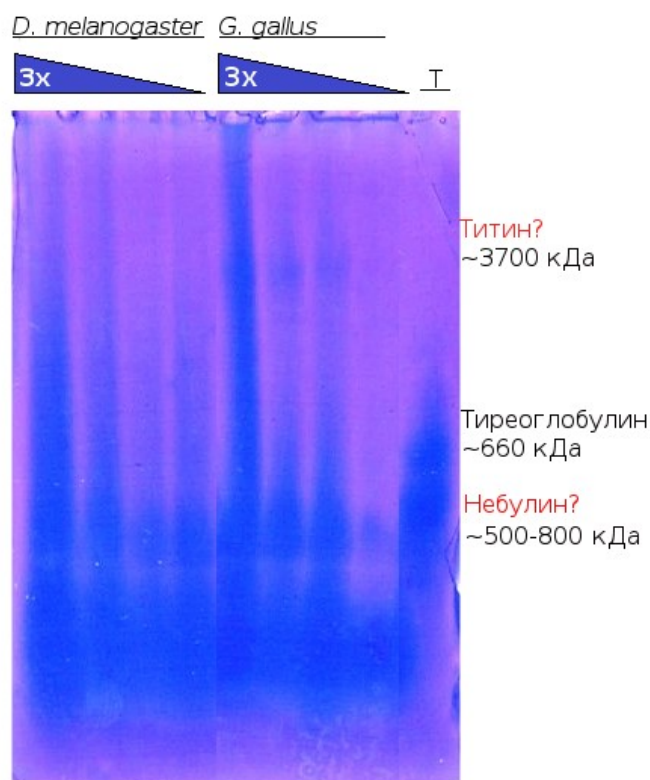


Рисунок 6. Белки высокой молекулярной массы можно выявлять с SDD-AGE. Гель окрашивали красителем Кумасси R-250. Пробы наносили по четыре трехкратных разведения, белки были полученные из дрозофилы и мышц курицы. Удалось детектировать белки большой молекулярной массы, предположительно – титин и небулин; в качестве маркера использовали коммерческий тиреоглобулин (Т).

В некоторых случаях нам удавалось видеть белки большой молекулярной массы (рисунок 6), предположительно соответствующие титину и небулину. Тем не менее, нам не всегда удавалось увидеть эти белки (таблица 5). Таким образом, подобные эксперименты требуют более тщательного подбора параметров выделения белка для достижения положительного результата. Тем не менее, ввиду трудоемкости и непостоянства получаемых результатов мы отказались от дальнейшего использования мышечных экстрактов.

Таблица 5. Используемый метод выделения и визуализации белков не является надежным способом детекции белков с высокой молекулярной массой.

Объект	Количество повторностей	Детекция белка	
		Небулин	Титин
<i>Chironomus sp.</i>	3	1	1
<i>Drosophila melanogaster</i>	3	2	1
<i>Gallus gallus</i>	2	1	1
<i>Rattus norvegicus</i>	1	0	0

Опираясь на данные, полученные в лаборатории М.Д. Тер-Аванесяна (Alexandrov *et al.* 2012), мы попробовали использовать вместо мышечных экстрактов коммерческий набор маркеров молекулярного веса ДНК (“Сибэнзим”), который наносили в лунку в количестве 2,4 мкг (рисунок 7). Поскольку детекцию ДНК и белков мы были вынуждены проводить на различных приборах, нам также пришлось использовать линейку для соотнесения масштаба фотографий. Перед окрашиванием отделяли дорожку геля с ДНК-маркером и окрашивали ее в растворе бромистого этидия (рисунок 7), потому что белковые маркеры тускнели после окрашивания в растворе бромистого этидия (данные не представлены).

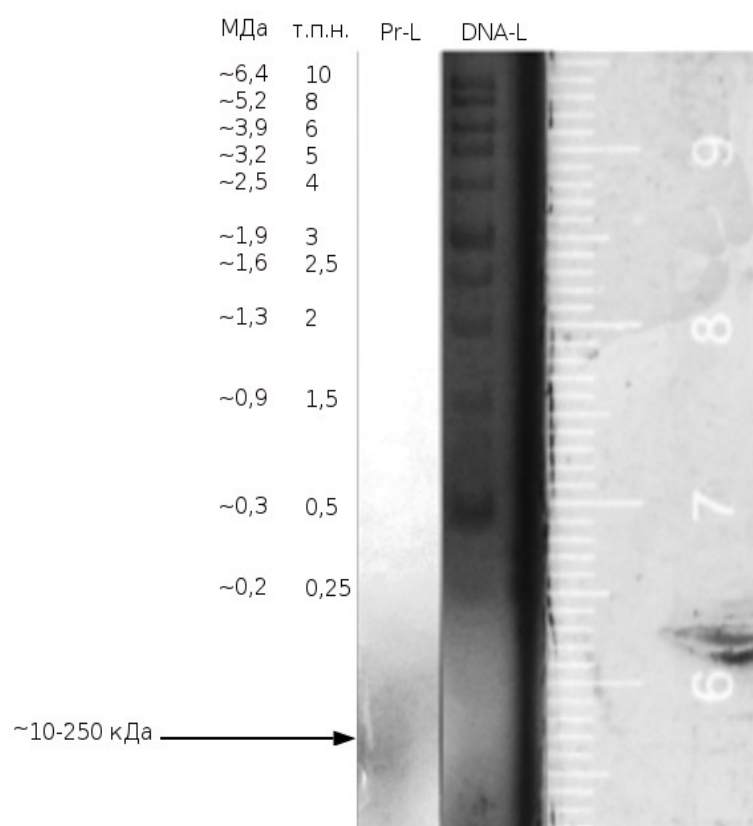


Рисунок 7. Маркеры молекулярного веса ДНК можно использовать в условиях SDD-AGE. Pr-L – фрагмент геля с маркерами молекулярного веса белков, DNA-L – фрагмент геля с маркерами молекулярного веса ДНК. Второй фрагмент геля красили в бромистом этидии, визуализация ДНК проводилась под ультрафиолетом.

Таким образом, нам не удалось разработать простой метод выделения высокомолекулярных белков из мышц животных, однако, мы подтвердили известные данные (Alexandrov *et al.* 2012) о том, что коммерческий набор молекулярных маркеров ДНК может быть использован для анализа размеров агрегатов в условиях SDD-AGE.

3.2. Влияние стадии роста культуры на размер агрегатов

Также перед нами стояла задача сравнить размеры агрегатов Sup35 на разных стадиях роста культуры дрожжей. Известно, что диапазон размера агрегатов зависит от оптической плотности при сборе культуры (С.А. Бондарев, К. Wang, личные сообщения), это может быть причиной артефактов при сравнении культур с разной оптической плотностью. Для определения диапазона оптической плотности, при которой размер агрегатов остается неизменным, мы провели эксперимент с выделением белка из культур, находящихся на разных стадиях роста.

На первом этапе работы мы применили метод выделения белка с использованием стеклянных шариков (Kushnirov *et al.* 2006) для изучения клеток штамма OT56, который несёт прион [*PSI*⁺]. Этот метод широко используется в нашей лаборатории. Часть проб кипятили в 2% SDS, так как агрегаты при кипячении деградируют, высвобождая мономеры. Другую половину инкубировали при комнатной температуре. Мы получили ожидаемые результаты: в кипяченой пробе мы наблюдали только мономеры Sup35, а в некипяченой пробе – агрегаты (рисунок 8). Таким образом, методика выделения белка с помощью стеклянных шариков была освоена, что необходимо для дальнейшей работы.

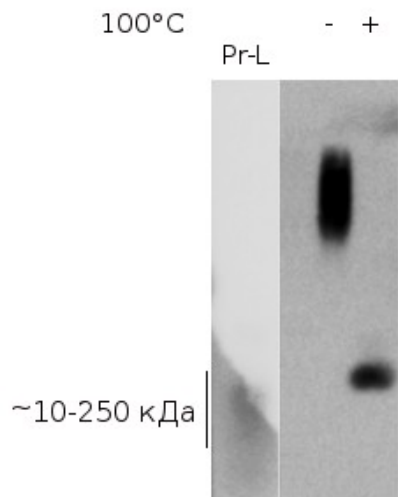


Рисунок 8. Методика с разрушением клеток стеклянными шариками позволяет детектировать наличие приона [*PSI*⁺]. На рисунке представлены результаты вестерн-блот-гибридизации. Для детекции Sup35 мы использовали смесь антител (SE4290 и SE4291). Часть проб кипятили (+) при 100°C, другую часть проб инкубировали при комнатной температуре (-). Pr-L – фрагмент мембраны с белковыми маркерами.

Далее мы перешли к проверке предположения об изменении размеров агрегатов Sup35 в зависимости от стадии роста культуры. Для этого мы использовали клетки, собранные при разных значениях оптической плотности. Перед проведением SDD-AGE

пробы выравнивали по количеству наносимого белка. Для этого мы провели электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) и окрасили гель Кумасси. Затем мы оценили оптическую плотность с помощью программы ImageJ и на основании полученных данных уравнили концентрацию белка в пробах. На агарозный гель наносили уже одинаковое количество белка и проводили SDD-AGE с последующей вестерн-блот-гибридизацией. Нам удалось детектировать, что при увеличении оптической плотности культуры с 0,2 до 1,5 размер агрегатов увеличивается, однако когда оптическая плотность достигает значения 3 и более размер агрегатов уменьшается (рисунок 9). Таким образом, диапазон размера агрегатов зависит от оптической плотности культуры в момент сбора клеток, поэтому в экспериментах со сравнением желательно использовать все культуры на одной стадии роста.

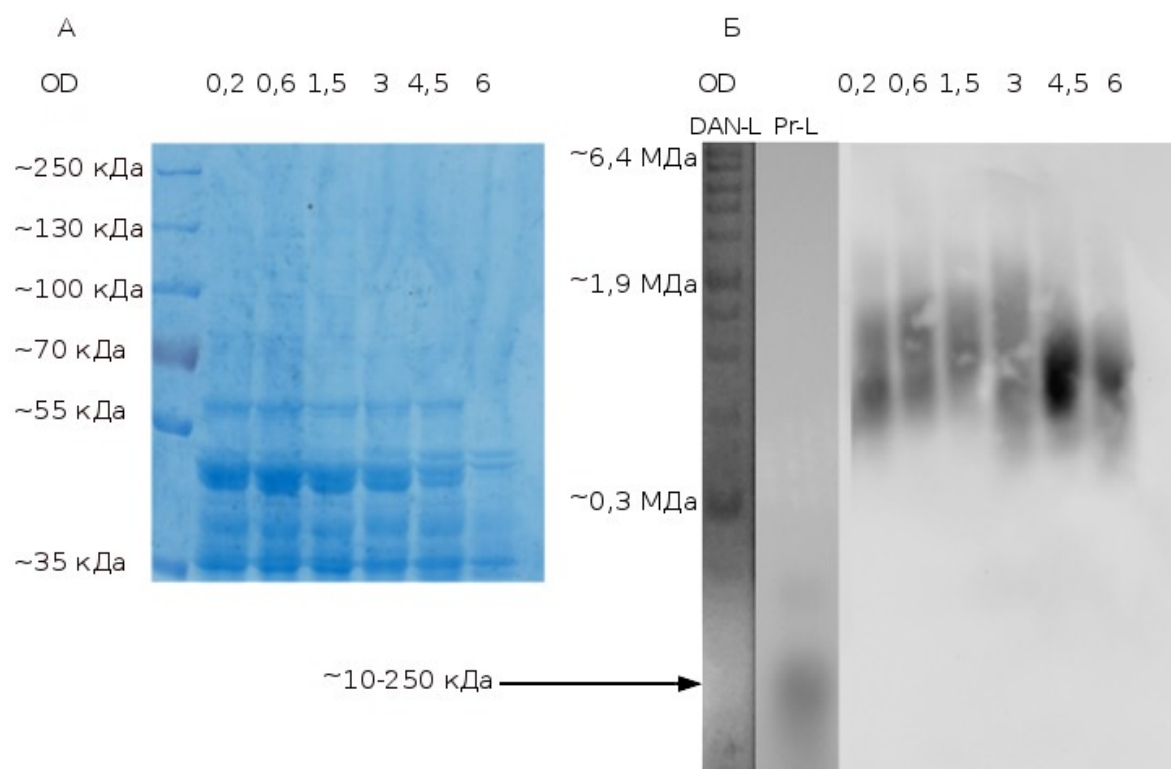


Рисунок 9. Диапазон размеров агрегатов зависит от оптической плотности культуры. А – SDS-PAGE, гель окрашен раствором Кумасси R-250. Пробы, которые использовали для SDS-PAGE, после выравнивали по концентрации белка, и только потом наносили на агарозный гель. Б – Представлены результаты SDD-AGE с последующей вестерн-блот гибридации. Для детекции Sup35 мы использовали смесь антител (SE4290 и SE4291). Pr-L – фрагмент мембраны с белковыми маркерами. DNA-L – фрагмент геля с маркерами молекулярного веса ДНК, окрашенного раствором бромистого этидия, визуализация маркеров ДНК проводилась под ультрафиолетом.

3.3. Улучшение метода выделения белка из клеток дрожжей

Главной целью нашей работы было улучшение метода выделения белка из клеток дрожжей для изучения агрегатов Sup35, формирующихся при возникновении приона $[PSI^+]$. В нашей лаборатории используется методика выделения белка с помощью механического разрушения клеток стеклянными шариками (далее — механический способ), но эта методика имеет ряд существенных недостатков. Суть метода состоит в том, что осажденные клетки гомогенизируют с помощью стеклянных шариков, после чего лизат отделяют от шариков, а затем из лизата с помощью центрифугирования удаляют остатки клеток. Часто при использовании этой методики нужно тратить много времени на отделение лизата от стеклянных шариков, особенно при большом количестве проб. Опираясь на литературные источники, мы искали более быстрый метод выделения белка. Методика выделения белка с использованием сферопластов (далее — сферопластный способ) (Halfmann and Lindquist 2008) гораздо выгоднее по времени и позволяет одновременно обрабатывать большее количество проб. При использовании этой методики не нужно использовать стеклянные шарики: осажденные клетки инкубируют в растворе зимолиазы, после чего полученные сферопласты осаждают, а затем гомогенизируют в лизирующем буфере, после чего осаждают обломки клеток. Освоение этой методики мы начали со сравнения эффективности выделения белка с помощью механического, либо сферопластного способа, по протоколам, описанным в литературе (Kushnirov *et al.* 2006; Halfmann and Lindquist 2008).

В эксперименте использовали штаммы 10-7A-Д832 ($[PSI^+]$) и 7A-Д832 ($[psi^-]$). Из одинакового количества клеток каждого штамма выделяли белок с помощью сравниваемых методов. Полученные пробы наносили на SDD-AGE, после чего переносили белки на мембрану и производили гибридизацию с антителами к Sup35. При выделении белка с помощью сферопластирования, мы выполняли условия, указанные в методике (Halfmann and Lindquist 2008). В обоих случаях можно было наблюдать сходные по размеру агрегаты Sup35 в штамме 10-7A-Д832 ($[PSI^+]$), это продемонстрировало, что их размер не меняется при разных способах метода выделения белка (рисунок 10). Тем не менее, полученные данные свидетельствуют, что способ выделения белка мог оказывать влияние на количество агрегатов в пробах: при использовании сферопластного способа агрегатов Sup35 было меньше. Поскольку это могло быть связано с общей

эффективностью выделения белка, мы решили проверить количество белка в пробах с помощью SDS-PAGE (см. далее).

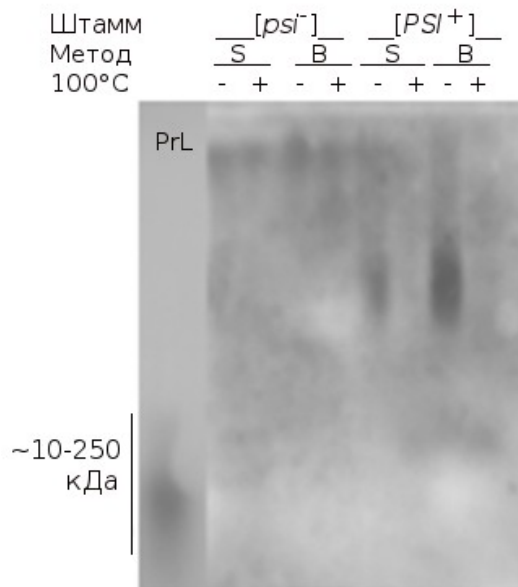


Рисунок 10. Как механический метод, так и сферопластный метод позволяют детектировать агрегаты с помощью SDD-AGE. В – механический способ выделения белка, S – сферопластный способ выделения белка. Использовали штаммы [PSI⁺] и [psi⁻]. «+» – кипячение в течение 5 минут при 100 °C, «-» – инкубация проб в течение 5 мин. при комнатной температуре. Pr-L – фрагмент мембраны с белковыми маркерами.

Таким образом, мы отметили, что в случае метода со сферопластами агрегаты видны хуже при одинаковом количестве материала. Менее эффективное выделение белка в случае методики с использованием сферопластов привело нас к необходимости модификации протокола выделения белка.

Первым параметром, который мы решили изменить, стало время обработки клеток зимолиазой. В методике рекомендовано инкубировать пробу в растворе с этим ферментом около 30 минут при 30 °C (Halfmann and Lindquist 2008). Мы хотели проверить, повлияет ли изменение времени инкубации в растворе зимолиазы на эффективность выхода белка. Для это мы проводили эксперименты, в которых использовали разное время инкубации (от 15 до 60 минут), после чего проводили выделение белка согласно методике (Halfmann and Lindquist 2008). Параллельно с этим производили выделение белка механическим способом. Полученные таким образом пробы были для нас контролем, с которым мы сравнивали эффективность выделения белка при использовании сферопластного способа. Для оценки количества белка в пробах мы использовали SDS-PAGE с последующей окраской гелей в растворе Кумасси. Часть проб перед нанесением кипятили при 100 °C в

течение 5 минут, а другую часть проб инкубировали при комнатной температуре. Кипяченые пробы были для нас эталоном тотального белка, поскольку в них все белки, включая протеазы, находились в полностью денатурированном состоянии. Лизаты, выделенные разными способами, использовали для SDS-PAGE, затем гель красили в растворе Кумасси R-250 (рисунок 11), и далее мы оценивали эффективность выделения белка по интенсивности окраски и чёткости полос. Нам удалось обнаружить, что увеличение времени инкубации клеток с зимолиазой увеличивает эффективность лизиса клеток и количество белка в лизата. Тем не менее, это не предотвращает деградацию белков, которая особенно хорошо заметна для белков с высокой молекулярной массой в некипяченых пробах (рисунок 11 А).

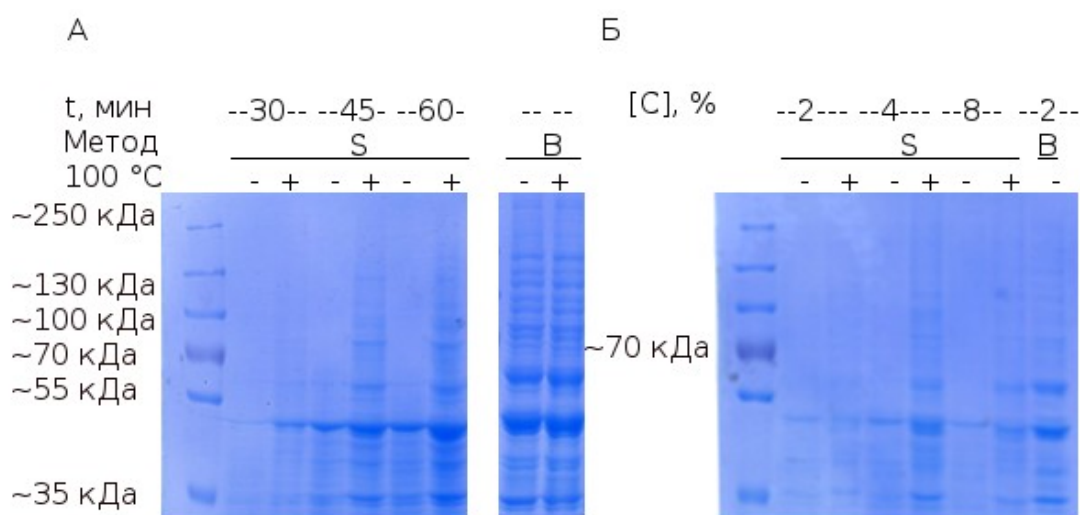


Рисунок 11. Увеличение времени обработки зимолиазой или же концентрации ингибиторов протеаз в лизирующем буфере незначительно повышают эффективность выделения белка сферопластным способом. А – результаты эксперимента по изменению времени инкубации в растворе зимолиазы; Б – результаты эксперимента по изменению концентрации раствора ингибиторов протеаз в лизирующем буфере. t – время инкубации в растворе зимолиазы в минутах, [C] – процентная концентрация коктейля ингибиторов, 100 °C – кипячение лизата, «+» – кипячение в течение 5 минут при 100 °C, «-» – инкубация проб в течение 5 мин при комнатной температуре, S – выделение белка с помощью сферопластирования (spheroplasting), B – с помощью механического разрушения клеток стеклянными шариками (beads).

В фирменных рекомендациях по работе с ферментом зимолиазой (MPBiomedicals 2009a), в протоколах разных лабораторий (Scott and Schekman 1980; Shibata *et al.* 1983) есть информация о том, что фермент зимолиаза загрязнен протеазами. В методике (Halfmann and Lindquist 2008) использовали зимолиазу (Zymolyase-100T) фирмы

"Seikagaku Corporation" (Seikagaku Corporation 2013), которая содержит 100 000 е.а./г фермента и $1,7 \times 10^4$ е.а./г протеаз. Мы использовали зимолиазу (Zymolyase-20T) фирмы "MPI", которая содержит 20 000 е.а./г фермента и $1,0 \times 10^4$ е.а./г (что в 5 раз больше при пересчете на 1 е.а. фермента, чем для фермента Seikagaku Corporation). Именно поэтому в других протоколах очень часто используют дополнительные растворы, содержащие ингибиторы протеаз (GoldBiotechnology 2015). В некоторых случаях используют специальные буферы для зимолиазы, обеспечивающие максимальный уровень ферментативной активности (MPBiomedicals 2009b). Кроме того, отличие двух ферментов зимолиаз с разной активностью состоит ещё и в том, что зимолиаза-100T является лиофилизированным ферментом, очищенным с помощью аффинной хроматографии (MPBiomedicals 2009b), а зимолиаза-20T — лиофилизированный порошок, полученный высаливанием с сульфатом аммония из культуральной жидкости (Catalog Number:320921 2009). Можно предположить, что во втором случае количество примесей будет больше. Всё это навело нас на предположение о том, что деградация белков в некипяченых пробах связана с активностью протеаз. Поэтому в следующем эксперименте мы попробовали изменить концентрацию ингибиторов протеаз.

На этом этапе мы использовали разное количество коктейля ингибиторов протеаз: 20, 40 и 80 мкл на 1 мл лизирующего буфера. Ингибиторы протеаз добавляли в лизирующий буфер, в котором гомогенизировали сферопласты после обработки зимолиазой. Также параллельно в качестве контроля готовили пробы по методике с использованием стеклянных шариков. В обоих случаях часть проб кипятили при 100 °C в SDS в течение 5 минут. Такая обработка приводит к денатурации всех белков, включая протеазы, и позволяет значительно снизить дальнейшую деградацию белка. Последующее сравнение кипяченых проб с некипячеными позволяет делать вывод об активности протеаз в анализируемых образцах. В этом эксперименте мы не увидели четкой зависимости количества выделяемого белка от концентрации коктейля ингибиторов протеаз (рисунок 11).

Поскольку изменение концентрации ингибиторов протеаз не повлияло на качество выделения белка, мы решили попробовать добавить PMSF (фенилметилсульфонилфторид) в сферопластирующий буфер. Дело в том, что в некоторых статьях (Shibata *et al.* 1983) указывают, что добавление PMSF к зимолиазе снижает активность протеаз. PMSF представляет собой ингибитор сериновых протеаз, обычно используемый при получении клеточных лизатов. В некоторых источниках написано, что PMSF широко используют для

предотвращения протеолиза различных белков в процессе их очистки (Gordon 1978). Поэтому на следующем этапе эксперимента мы решили проверить качество сферопластирования в буфере изменённого состава с каждым из двух ферментов. В эксперименте использовали два разных штамма: 10-7А-Д832 и ОТ56 — потому что эти штаммы отличаются по склонности к комкованию и по эффективности трансформации (С.А. Бондарев, П.Б. Дроздова, О.М. Землянко, личные сообщения). Штамм ОТ56 очень широко используется в лабораториях для исследования дрожжевых прионов, в частности [*PSI*⁺]. Все эти данные свидетельствуют о разных особенностях клеточной стенки, поэтому мы предположили, что сферопластирование у них будет идти с разной эффективностью. Для клеток штамма 10-7А-Д832 характерна большая склонность к комкованию, чем для клеток штамма ОТ56 (рисунок 12), поэтому зимолиаза может действовать на них с разной эффективностью, а следовательно для эффективного выделения белка может быть нужно разное время инкубации.

Согласно фирменным рекомендациям (MPBiomedicals 2009b) минимальное время инкубации в растворе зимолиазы составляет 15 минут. В использованной нами методике время инкубации в растворе составляет около 30 минут (Halfmann and Lindquist 2008). Для подбора оптимального времени мы взяли четыре точки с интервалом в 15 минут для определения качества сферопластирования. Мы ресуспендировали осадок клеток в сферопластирующем буфере с зимолиазой. Сначала отбирали аликвоты каждые 15 минут и измеряли оптическую плотность суспензии при длине волны 600 нм. Концентрацию клеток в ней с помощью камеры Горяева, предварительно добавив 1% SDS для оценки лизиса клеток. Интактные клетки можно было наблюдать до 15 минут инкубации, после первых 30 минут можно видеть резкий спад числа клеток, при инкубации в течение часа редко можно было найти даже одну клетку (рисунок 12).

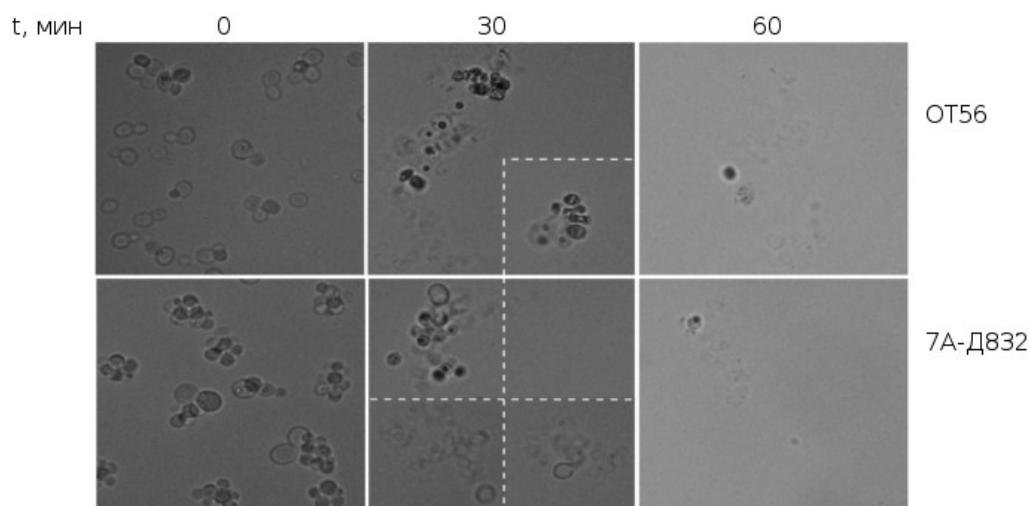


Рисунок 12. Качество сферопластирования зависит от времени инкубации в растворе зимолиазы, t – время инкубации в растворе зимолиазы. Пунктиром разделены фрагменты разных полей зрения. Фотографии были сделаны при одинаковом увеличении и яркости.

Аналогичный эксперимент проводили с использованием литиказы, на тех же двух штаммах: OT56 и 10-7A-Д832 (рисунок 13). Мы использовали такие же временные интервалы для инкубации проб в растворе с литиказой и PMSF, как и в эксперименте с зимолиазой. После того, как мы добавили сферобластирующий буфер с литиказой и PMSF к пробе и хорошо ресуспендировали, мы отбирали аликвоту и измеряли её оптическую плотность при 600 нм, параллельно с этим производили подсчет клеток на камере Горяева, предварительно добавив 1% SDS для оценки лизиса клеток.

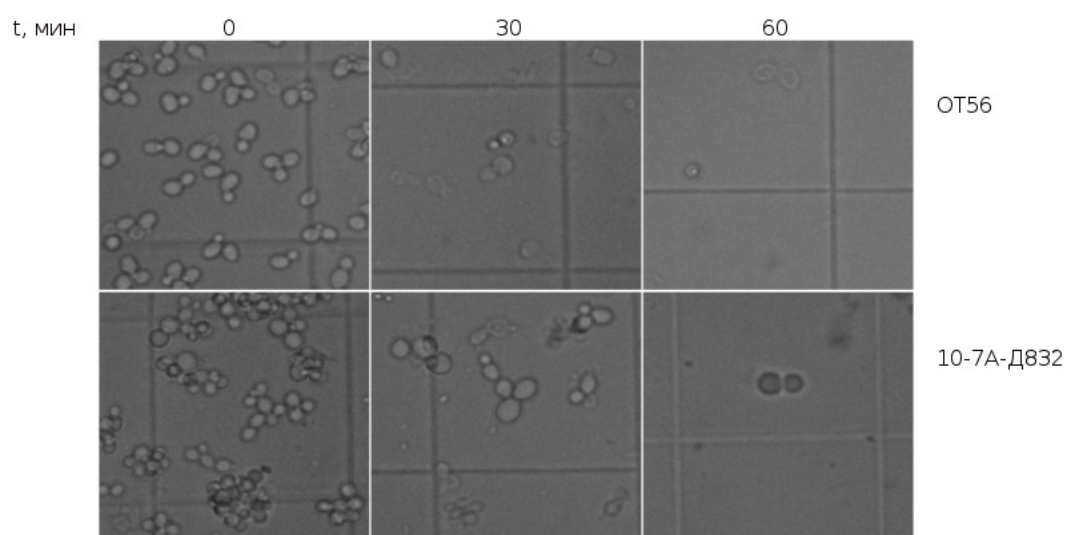


Рисунок 13. Качество сферопластирования улучшается с увеличением времени инкубации в растворе литиказы и PMSF. t – время инкубации в растворе литиказы с PMSF. Фотографии были сделаны при одинаковом увеличении и яркости.

Для каждого штамма производили по 4 повторности эксперимента, полученные данные заносили в таблицу для обоих штаммов, после переводили значения в относительные (за 100% брали значение OD или количество клеток в первой временной точке), затем считали медианы и на основании этих значений строили графики зависимости оптической плотности (рисунок 14) и количества клеток (рисунок 15) от времени инкубации пробы в растворе литиказы с PMSF. Мы видели резкий спад обоих показателей на первых 15 минутах для обоих штаммов, на что мы уже успели обратить внимание при просмотре препаратов (рисунок 13), затем следует более постепенное снижение значений с выходом на плато в районе 60 минут.

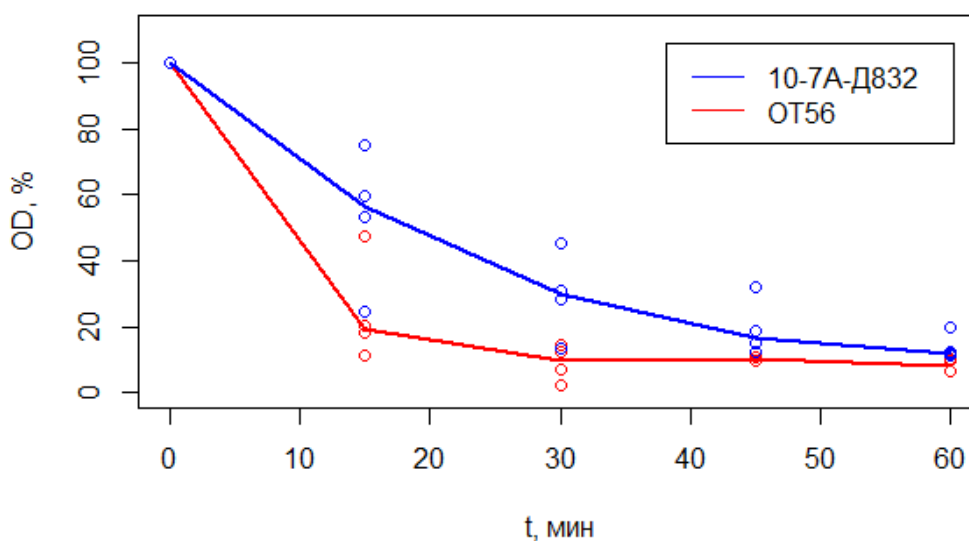


Рисунок 14. Оптическая плотность уменьшается с увеличением времени инкубации клеток в растворе литиказы с PMSF. Для каждого штамма проводили по 4 эксперимента с подсчетом оптической плотности. Начальную оптическую плотность в каждом эксперименте брали за 100%, остальную оптическую плотность представляли в виде процента от 100. Считали медианы по 4 экспериментам, остальные значения обозначили точками, t – время инкубации в растворе литиказы с PMSF, OD – оптическая плотность.

Для разных штаммов значения показателей варьировали. На основании построенных графиков мы сделали вывод о том, что оптимальное время инкубации для штамма OT56 составляет от 30 до 45 минут, а для штамма 10-7A-Д832 требуется более длительное время инкубации (от 40 до 60 минут), что может быть связано с большей склонностью клеток данного штамма к комкованию.

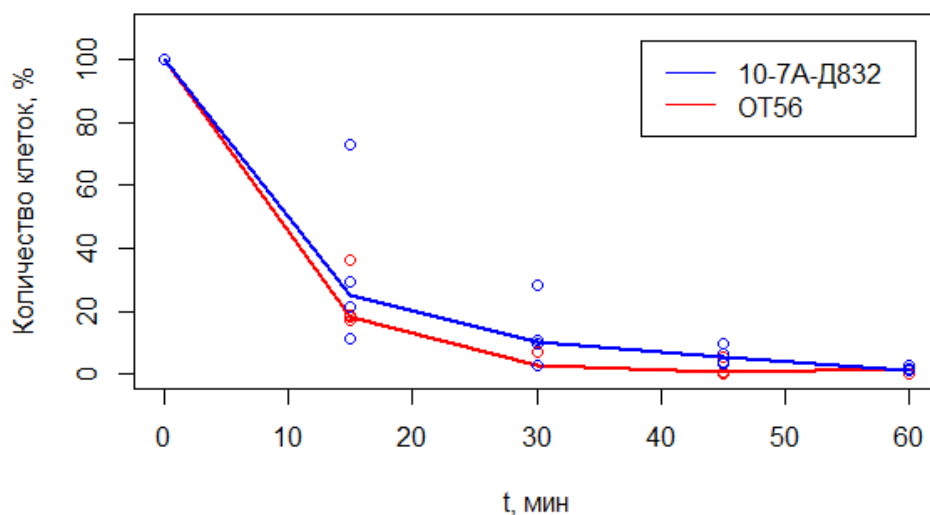


Рисунок 15. Количество клеток уменьшается с увеличением времени инкубации в растворе литиказы с PMSF. Для каждого штамма проводили по 4 эксперимента с подсчетом числа клеток. Начальное число клеток в каждом эксперименте брали за 100%, остальное количество клеток представлено в виде процента от 100 случайно посчитанных клеток, находили медианы по 4 экспериментам, остальные значения обозначили точками, t – время инкубации в растворе литиказы с PMSF.

Далее мы решили сравнить эффективность выделения белка при использовании двух разных ферментов, а также при увеличении концентрации PMSF в лизирующем буфере (рисунок 16). Выделение белка механическим способом было для нас контролем. Как и в предыдущих экспериментах, часть проб кипятили с SDS, для получения эталонного не деградированного тотального белка. Эффективность выделения белка определяли с помощью SDS-PAGE (рисунок 16).

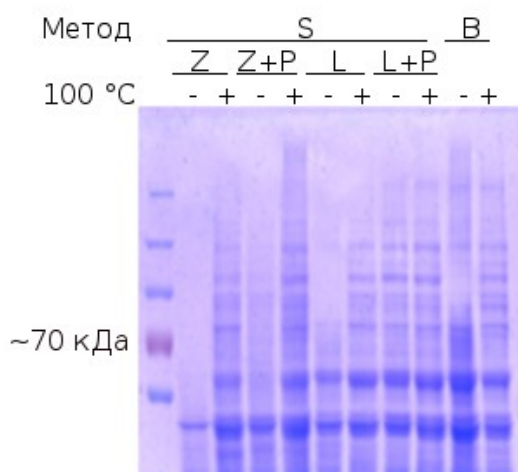


Рисунок 16. Использование литиказы с PMSF позволяет увеличить эффективность выделения белков с высокой молекулярной массой при сферопластном способе выделения белка. 100 °C – кипячение пробы, + – кипячение в течение 5 минут при 100 °C, - – инкубация проб в течение 5 мин при комнатной температуре. Z – зимолиаза (Zymolyase), L – литиказа (Lyticase), S – сферопластный, B – механический способ выделения белка, Pr-L – Фрагмент мембраны с маркерами молекулярного веса белков.

Согласно полученным результатам, эффективность выделения белка возрастала после добавления PMSF, вероятно, за счет уменьшения его деградации. Кроме того, мы смогли продемонстрировать более эффективную работу литиказы по сравнению с зимолиазой при сферопластном способе выделения белка. Таким образом, нам удалось увеличить эффективность выделения белка при сферопластном методе.

Далее мы проводили эксперименты по сравнению эффективности лизиса белка клеток собранных из культур с разной оптической плотностью. Также мы хотели определить оптимально время инкубации для культур на разной стадии роста. В эксперименте использовали штамм OT56. Пробы, полученные механическим способом использовали как контроль. В данном эксперименте мы не использовали кипяченные пробы, так как на предыдущих этапах мы подобрали оптимальное количество ингибиторов протеаз, позволяющее существенно снизить деградацию белка. Эффективность выделения белка определяли с помощью SDS-PAGE (рисунок 17 А). Затем оценивали оптическую плотность с помощью программы ImageJ и на основании полученных данных выравнивали концентрацию белка в пробах. Пробы с одинаковым количеством белка наносили на агарозный гель, затем проводили SDD-AGE, что бы проанализировать наличие агрегатов Sup35. После этого, мы делали вестерн-блоттинг и видели, что эффективность выделения белка зависит от времени инкубации в растворе литиказы с PMSF и от оптической плотности при сборе культуры (рисунок 17 Б).

Следовательно, нам удалось улучшить метод выделения белка для изучения агрегатов приона [PSI^+], подобрать оптимальные параметры для эффективного сферопластирования клеток. Мы смогли продемонстрировать, как с помощью определения качества сферопластирования можно подобрать оптимальное время инкубации для проб с разной оптической плотностью при сборе культуры клеток. Таким образом, у нас получилось ввести такие условия, при которых сферопластный способ выделения белка не уступает механическому способу выделения белка из клеток дрожжей.

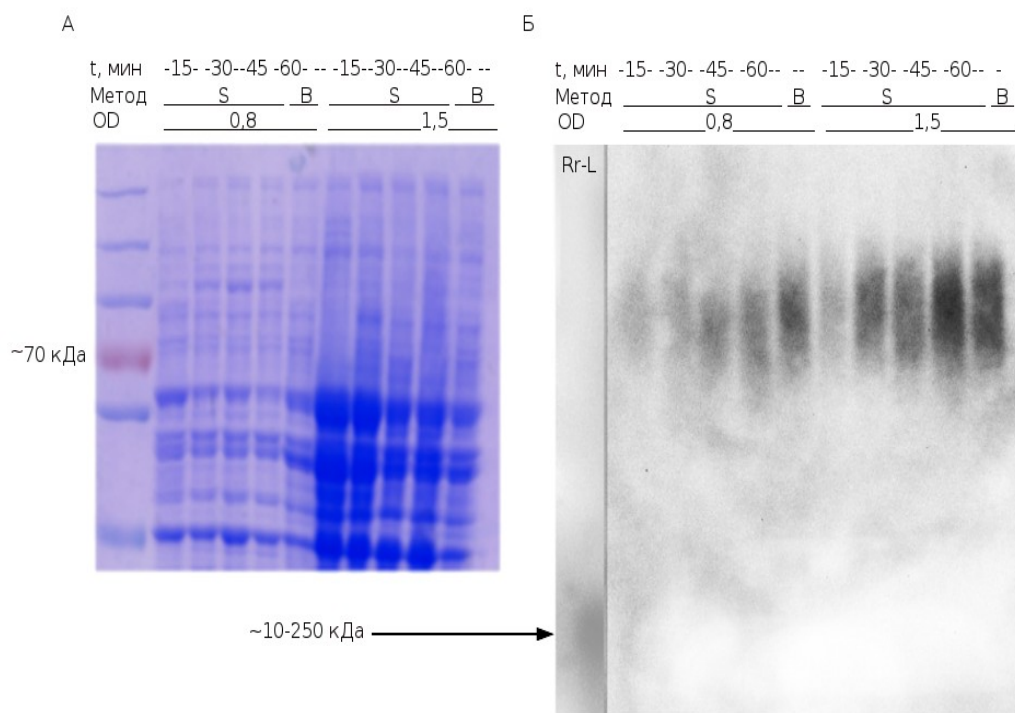


Рисунок 17. Увеличение времени инкубации в растворе литиказы с PMSF позволяет получить сферопластным способом пробы не уступающие по качеству пробам полученным механическим способом. А – SDS-PAGE, гель красили в Кумасси 0,025%, Б – результаты детекции мембраны, Rr-L – Фрагмент мембраны с маркерами молекулярного веса белков, t – время инкубации в растворе литиказы с PMSF, S – сферопластный способ выделения белка, В – механический способ выделения белка, OD – оптическая плотность.

4. ВЫВОДЫ

1. Коммерческий набор маркеров молекулярного веса ДНК более удобен для оценки размера крупных белковых комплексов с помощью SDD-AGE, чем мышечные экстракты животных.
2. Диапазон размера агрегатов зависит от оптической плотности при сборе культуры, поэтому для анализа размеров агрегатов Sup35 очень важно использовать культуры на одинаковой стадии роста.
3. Модифицированный протокол выделения белка из сферопластов, на основе метода, предложенного Халфманном и Линдквист (Halfmann and Lindquist 2008), не уступает механическому способу, предложенному Кушниковым и др. (Kushnirov et al. 2006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abramoff, Michael Magalhães P., 2005 Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int.* 11: 36–43.
2. Aiken J. M., Marsh R. F., 1990 The search for scrapie agent nucleic acid. *Microbiol. Rev.* 54: 242–6.
3. Alberti S., Halfmann R., King O., Kapila A., 2009 A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell* 137: 146–158.
4. Alexandrov A. I., Polyanskaya A. B., Serpionov G. V., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V., 2012 The effects of amino acid composition of glutamine-rich domains on amyloid formation and fragmentation. *PLoS One* 7: e46458.
5. Apweiler R., Bairoch A., Wu C. H., 2004 Protein sequence databases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 76–80.
6. Bailleul P. A., Newnam G. P., Steenbergen J. N., Chernoff Y. O., 1999 Genetic study of interactions between the cytoskeletal assembly protein Sla1 and prion-forming domain of the release factor Sup35 (eRF3) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 153: 81–94.
7. Bateman D. A., Wickner R. B., 2013 The $[PSI^+]$ prion exists as a dynamic cloud of variants. *PLoS Genet.* 9: 1–13.
8. Bertram G., Bell H. a, Ritchie D. W., Fullerton G., Stansfield I., 2000 Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *RNA* 6: 1236–1247.
9. Bondarev S. A., Shchepachev V. V., Kajava A. V., Zhouravleva G. A., 2013 Effect of charged residues in the N-domain of Sup35 protein on prion $[PSI^+]$ stability and propagation. *J. Biol. Chem.* 288: 28503–28513.
10. Brown J. C. S., Lindquist S., 2009 A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion. *Genes Dev.* 23: 2320–2332.
11. Buxbaum J. N., Linke R. P., 2012 A molecular history of the amyloidoses. *J. Mol. Biol.* 421: 142–159.
12. Caughey B., Lansbury P. T., 2003 Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 267–298.
13. Chabelskaya S., Kiktev D., Inge-Vechtomov S., Philippe M., Zhouravleva G., 2004 Nonsense mutations in the essential gene *SUP35* of *Saccharomyces cerevisiae* are non-lethal. *Mol. Genet. Genomics* 272: 297–307.

14. Chernoff Y. O., Newnam G. P., Kumar J., Allen K., Zink A. D., 1999 Evidence for a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone ssb in formation, stability, and toxicity of the *[PSI]* prion. *Mol. Cell. Biol.* 19: 8103–12.
15. Cohen F. E., Kelly J. W., 2003 Therapeutic approaches to protein-misfolding diseases. *Nature* 426: 905–909.
16. Corporation Seikagaku biobusiness, 2013 Sample Data Sheet, CATALOG # 120493-1. <http://www.amsbio.com/datasheets/120493-1.pdf> : 1–2.
17. Cox B. S., 1964 A recessive lethal super-suppressor mutation in yeast and other *psi* phenomena. *Hered.* 26: 211–232.
18. Crow E. T., Li L., 2011 Newly identified prions in budding yeast, and their possible functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22: 452–459.
19. Derkatch I. L., Chernoff Y. O., Kushnirov V. V., Inge-Vechtomov S. G., Liebman S. W., 1996 Genesis and variability of *[PSI]* prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144: 1375–1386.
20. Derkatch I. L., Bradley M. E., Zhou P., 1997 Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the *[PSI]* prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 147: 507–519.
21. Diaz-Avalos R., King C.-Y., Wall J., Simon M., Caspar D. L. D., 2005 Strain-specific morphologies of yeast prion amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 10165–70.
22. Eaglestone S. S., Cox B. S., Tuite M. F., 1999 Translation termination efficiency can be regulated in *Saccharomyces cerevisiae* by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 18: 1974–1981.
23. Fowler D. M., Koulov A. V., Alory-Jost C., Marks M. S., Balch W. E., *et al.*, 2006 Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 4: 0100–0107.
24. Gold Biotechnology, 2015 Yeasty cell lysis buffer. <https://www.goldbio.com/documents/2548/Yeast+cell+lysis+buffer-product+information+and+protocol.pdf>.
25. Gordon J., 1978 Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Anal. Biochem.* 86: 574–579.
26. Granzier H., Radke M., Royal J., Wu Y., Irving T. C., *et al.*, 2007 Functional genomics of chicken, mouse, and human titin supports splice diversity as an important mechanism for regulating biomechanics of striated muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293: R557–67.
27. Halfmann R., Lindquist S., 2008 Screening for amyloid aggregation by semi-denaturing detergent-agarose gel electrophoresis. *J. Vis. Exp.*: 20–22.

28. Halfmann R., Wright J. R., Alberti S., Lindquist S., Rexach M., 2012 Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin. *Prion* 6: 391–399.
29. Hinnen A., Hicks J. B., Fink G. R., 1978 Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 1929–33.
30. Hosoda N., Kobayashi T., Uchida N., Funakoshi Y., Kikuchi Y., *et al.*, 2003 Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *J. Biol. Chem.* 278: 38287–38291.
31. Jacquemont T., Vico Fallani F. De, Bertrand A., Epelbaum S., Routier A., *et al.*, 2017 Amyloidosis and neurodegeneration result in distinct structural connectivity patterns in mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging*: 1–40.
32. Kaiser P., Mansourl H. A., Greeten T., Auer B., Schweiger M., *et al.*, 1994 The human ubiquitin-conjugating enzyme UbcH1 is involved in the repair of UV-damaged, alkylated and cross-linked DNA. *FEBS Lett.* 350: 1–4.
33. Kryndushkin D. S., Alexandrov I. M., Ter-Avanesyan M. D., Kushnirov V. V., 2003 Yeast [*PSI*⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *J. Biol. Chem.* 278: 49636–49643.
34. Kushnirov V. V., Alexandrov I. M., Mitkevich O. V., Shkundina I. S., Ter-Avanesyan M. D., 2006 Purification and analysis of prion and amyloid aggregates. *Methods* 39: 50–55.
35. Liebman S. W., Chernoff Y. O., 2012 Prions in yeast. *Genetics* 191: 1041–1072.
36. Liu et al., 2002 Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [*PSI*⁺]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 Suppl 4: 16446–53.
37. Manuelidis L., Lu Z. Y., 2003 Virus-like interference in the latency and prevention of Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5360–5365.
38. Matveenko A. G., Belousov M. V, Bondarev S. A., Moskalenko S. E., Zhouravleva G. A., 2016 Identification of new genes that affect [*PSI*⁺] prion toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Mol. Biol.* 50: 710–718.
39. MP Biomedicals, 2009a Catalog Number:320921 ZYMOLYASE -20T (from *Arthrobacter luteus*).<http://www.dia-m.ru/upload/iblock/4ce/541-mpbiomedicals.pdf>. : 100–101.
40. MP Biomedicals, 2009b Catalog Number: 320931, 320932Zymolyase-100T From *Arthrobacter luteus*.<http://www.mpbio.com/product.php?pid=0832093>. : 1–7.
41. Nave R., 1989 Visualization of the polarity of isolated titin molecules : a single globular head on a long thin rod as the M band anchoring domain? *109: 2177–2187*.

42. Newnam G. P., Wegrzyn R. D., Lindquist S. L., Chernoff Y. O., 1999 Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1325–1333.
43. Nizhnikov A. A., Antonets K. S., Inge-Vechtomov S. G., 2015 Amyloids: from pathogenesis to function. *Biochem. Biokhimiia* 80: 1127–44.
44. Patel B. K., Gavin-Smyth J., Liebman S. W., 2009 The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nat Cell Biol.* 16: 338–348.
45. Patino M. M., Liu J., Glover J. R., Lindquist S., 1996 Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *173*: 1–5.
46. Prusiner S. B., Hadlow W. J., Eklund C. M., Race R. E., Cochran S. P., 1978 Sedimentation characteristics of the scrapie agent from murine spleen and brain. *Biochemistry* 17: 4987–92.
47. Prusiner S. B., McKinley M. P., Bowman K. A., Bolton D. C., Bendheim P. E., *et al.*, 1983 Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35: 349–358.
48. Prusiner S. B., 1998 Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 13363–13383.
49. Rochin L., Hurbain I., Serneels L., Fort C., Watt B., *et al.*, 2013 BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 10658–63.
50. Rogoza T., Goginashvili A., Rodionova S., Ivanov M., Viktorovskaya O., *et al.*, 2010 Non-Mendelian determinant [*ISP*⁺] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 10573–7.
51. Rose M., Winston F., 1984 Identification of a Ty insertion within the coding sequence of the *S. cerevisiae* *URA3* gene. *Mol. Gen. Genet.* 193: 557–560.
52. Rosen R. F., Tomidokoro Y., Ghiso J. a, Walker L. C., 2010 SDS-PAGE/immunoblot detection of Abeta multimers in human cortical tissue homogenates using antigen-epitope retrieval. *J. Vis. Exp.* 38: 4–7.
53. Saifitdinova A. F., Nizhnikov A. A., Lada A. G., Rubel A. A., Magomedova Z. M., *et al.*, 2010 [*NSI*⁺]: a novel non-Mendelian nonsense suppressor determinant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 56: 467–478.
54. Scott J. H., Schekman R., 1980 Lyticase : endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *J Bacteriol* 142: 414–423.
55. Shibata N., Mizugami K., Takano K., Suzuki S., 1983 Isolation of mannan-protein complexes from viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A wild type and *Saccharomyces cerevisiae* X2180-1A-5 mutant strains by the action of zymolyase-60,000. *J. Bacteriol.* 156: 552–558.

56. Simoneau S., Thomzig A., Ruchoux M.-M., Vignier N., Daus M. L., *et al.*, 2015 Synthetic scrapie infectivity: interaction between recombinant PrP and scrapie brain-derived RNA. *Virulence* 6: 37–41.
57. Sondheimer N., Lindquist S., 2000 Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol. Cell* 5: 163–172.
58. Staniforth G. L., Tuite M. F., 2012 Fungal prions. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 107: 417–456.
59. Stansfield I., Jones K. M., Ter-Avanesyan M. D., Tuite M. F., 1995 The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 4365–4373.
60. Struhl K., 1984 Genetic properties and chromatin structure of the yeast gal regulatory element: an enhancer-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81: 7865–9.
61. Sulatskaya A. I., Maskevich A. A., Kuznetsova I. M., Uversky V. N., Turoverov K. K., 2010 Fluorescence quantum yield of thioflavin T in rigid isotropic solution and incorporated into the amyloid fibrils. *PLoS One* 5: e15385.
62. Suzuki G., Shimazu N., Tanaka M., 2012 A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. *Science* 336: 355–359.
63. Taylor J. P., Hardy J., Fischbeck K. H., 2002 Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Source Sci. New Ser.* 296: 1991–1995.
64. The R Core Team, 2015 R: A language and environment for statistical computing. *R Found. Stat. Comput.* 3: 1–3487.
65. Tuite M. F., Cox B. S., 2003 Propagation of yeast prions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 878–890.
66. Tuite M. F., Staniforth G. L., Cox B. S., 2015 [PSI⁺] turns 50. *Prion* 9: 318–332.
67. Tycko R., 2011 NIH Public Access. *Annu Rev Phys Chem* 62: 279–299.
68. Valouev I. A., Kushnirov V. V., Ter-Avanesyan M. D., 2002 Yeast polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 are involved in cytoskeleton organization and cell cycle regulation. *Cell Motil. Cytoskeleton* 52: 161–173.
69. Viral P., Mountain R., Caughey B., Chesebro B., 1997 Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathies. *Trends Cell Biol.* 7: 56–62.
70. Wickner R. B., 1994 [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264: 566–569.
71. Xue C., Lin T. Y., Chang D., Guo Z., 2016 Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R. Soc. Open Sci.* 4: 1–14.

72. Zhiqiang Du, Kyung-Won Park H. Y., 2008 Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisia*. Nat Genet. 40: 724–732.
73. Zhouravleva G., Frolova L., Goff X. Le, Guellec R. Le, Inge-Vechtormov S., *et al.*, 1995 Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. EMBO J. 14: 4065–72.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хотелось бы выразить благодарность своему научному руководителю, Станиславу Александровичу Бондареву, за помощь в написание дипломной работы, методическое сопровождение, за высокий уровень педагогического такта и полезные советы, Дроздовой Полине Борисовне за помощь в освоение методов, грамотное руководство в процессе проведения эксперимента, помощь в подборе методик обработки результатов, а также за терпение и понимание. Хочу также поблагодарить Галину Анатольевну Журавлеву за возможность выполнения работы в лаборатории физиологической генетики и ценные советы, Юлию Викторовну Сопову за предоставленный образец мышц крысы (*Rattus norvegicus*), Андрея Георгиевича Матвеевко за предоставленные субклоны штаммов OT56 и 2-OT56. И конечно же, хотелось бы выразить благодарность всему коллективу лаборатории за помощь и ценные советы.